

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**



**Dissertação**

**Potencial indutor de resistência de compostos semissintéticos à antracnose  
do feijoeiro: mecanismos bioquímicos e de ação**

**Mario Fernando Pinel Alvarez**

**Pelotas, 2021**

**Mario Fernando Pinel Alvarez**

**Potencial indutor de resistência de compostos semissintéticos à antracnose  
do feijoeiro: mecanismos bioquímicos e de ação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Orientador (a): Profa. Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A314p Alvarez, Mario Fernando Pinel

Potencial indutor de resistência de compostos semissintéticos à antracnose do feijoeiro: mecanismos bioquímicos e de ação / Mario Fernando Pinel Alvarez ; Cândida Renata Jacobsen de Farias, orientadora. – Pelotas, 2021.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Colletotrichum lindemuthianum*. 2. Phenyl Se citronella. 3. Phenyl S citral. 4. Atividade enzimática. 5. Atividade antioxidante. I. Farias, Cândida Renata Jacobsen de, orient. II. Título.

CDD : 581.2

Mario Fernando Pinel Alvarez

**Potencial indutor de resistência de compostos semissintéticos à antracnose  
do feijoeiro: mecanismos bioquímicos e de ação**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 01 de novembro de 2021.

Banca examinadora:

Prof. <sup>a</sup> Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias (Orientadora)  
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. <sup>a</sup> Dra. Danielle Ribeiro de Barros  
Doutora em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Prof. <sup>a</sup> Dra. Maristela dos Santos Rey Borin  
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

Profa.<sup>a</sup> Dra. Bianca Obes Corrêa  
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas

*Dedico esta dissertação aos meus amados pais, ao meu irmão, e a toda a minha família, pelo amor e apoio incondicional sempre, em todos os momentos. Agradeço por terem me feito ver que, com sacrifício, fé e dedicação, eu alcançaria cada um dos meus sonhos. Pela orientação com sabedoria, estou alcançando uma das metas mais preciosas da minha existência.*

## Agradecimentos

A Deus e a Virgem Maria, por me protegerem e guiarem meu caminho, por me derem força de vontade e sustento para lutar por meus sonhos, objetivos e meta. Por terem me permitido nascer em uma família maravilhosa, que unida pelo amor, responsabilidade, fé, respeito e carinho, foi capaz de me inculcar valores éticos, morais, familiares e espirituais, dando-me assim, um valioso exemplo de melhorar através do sacrifício e da perseverança. *“Deus se eu errar, corrija-me, se eu me perder, guia-me, se eu pensar em me render, me mantenha na batalha, guia-me em sabedoria.”*

Aos meus pais, Mario Porfirio Pinel e Maria Carolina Alvarez, pelo amor, carinho, compreensão, motivação, inspiração, acompanhamento, apoio incondicional, por torcerem, acreditarem e orarem por mim em todos os momentos. A toda a minha família por esse enorme apoio e amor.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Fitossanidade, pela oportunidade da realização do Mestrado. Um sonho feito realidade!

A OEA e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, viabilizando assim, um dos grandes sonhos de todo ser humano, de conhecimento, aperfeiçoamento pessoal e, conseqüentemente, da esperança e certeza de poder contribuir com ele um ‘grão de areia’ para a sociedade, principalmente a do meu país, Honduras.

À professora Cândida Renata Jacobsen, pela disponibilidade, ensinamentos, compreensão e oportunidade de ter aceitado desenvolver meu mestrado sob sua orientação.

Aos professores e técnicos do Programa de Pós-Graduação de Fitossanidade (Fitopatologia), pelos ensinamentos e disponibilidade, permitindo assim, que eu pudesse adquirir conhecimentos, sempre motivado a seguir o caminho da pesquisa.

A todos os eternos colegas e irmãos que encontrei na minha estadia no Brasil. Obrigado pelo enorme apoio em tudo e pelo carinho. Estarei eternamente agradecido.

Enfim, agradeço a cada uma das pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir mais essa etapa.

Sem vocês querida família, amigos e professores, isso não teria sido possível. Muito obrigado!

*"The Family is the most important thing in the world" (Princess Diana)*

## Resumo

PINEL-ALVAREZ, Mario Fernando. **Potencial indutor de resistência de compostos semissintéticos à antracnose do feijoeiro**: mecanismos bioquímicos e de ação. Orientadora: Cândida Renata Jacobsen de Farias. 2021, 66 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Dentre as fungos que afetam a cultura do feijão destaca-se o *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., agente causal da antracnose, que ocasiona danos econômicos importantes aos produtores em todo o mundo. Dentre os fatores mais importantes que contribuem na disseminação do patógeno está o uso de sementes contaminadas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar respostas bioquímicas de defesa em plântulas, oriundas de sementes tratadas com moléculas que apresentam potencial antimicrobiano: O Phenyl Se Citronelal e o Phenyl S citral, em três concentrações ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ): 0,25%, 0,50% e 1%, após inoculadas artificialmente com *C. lindemuthianum* em meio modificado osmoticamente. Avaliou-se o índice de transmissão de doença, teores de clorofila totais e carotenoides, compostos fenólicos, derivados de lignina (LATG), metabolismo antioxidante, atividade superóxido dismutase (SOD), Catalase, (CAT), ascorbato peroxidase (APX), onde resultados promissores foram obtidos, demonstrado pelo análises bioquímicas através de espectrofotometria, principalmente nos tratamentos com a molécula Phenyl Se Citronelal, uma maior atividade em comparação à molécula Phenyl S Citral e os respectivos controles. Da mesma forma, foi avaliada a atividade enzimática ligadas à patogenicidade *in vitro*, usando médios sólidos específicos para análises de amilase, lipase, protease, pectinase, celulase, baixo efeito dos produtos Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral em três distintas concentrações ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ): 0,25%, 0,0625% e 0,125%, que não inibem em sua totalidade o crescimento do fungo para poder analisar a produção enzimática pelo mesmo. Avaliando a presença de halos de degradação, que quando positivos eram mensurados para realização do cálculo de Índice Enzimático (IE). A produção enzimática, o isolado *C. lindemuthianum* apresentaram performances em quatro das cinco enzimas em estudo, sendo a maior atividade nas enzimas lipase e protease. Concluindo-se que as moléculas testadas são promissoras, já que estão associadas com a proteção das sementes contra o patógeno, sendo observado que o recobrimento das mesmas diminuiu a incidência de *C. lindemuthianum*. Um maior acúmulo de substâncias químicas quanto a indução de resistência em plântulas de feijão, e na redução da atividade de enzimas ligadas a patogenicidade pelo fungo.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*. Phenyl Se Citronella. Phenyl S Citral. Atividade enzimática. Atividade antioxidante.

## Abstract

PINEL-ALVAREZ, Mario Fernando. **Resistance inducing potential of semi-synthetic composts to bean anthracnose:** biochemical and action mechanisms. Advisor: Cândida Renata Jacobsen de Farias. 2021. 66 f. Dissertation (Masters) - Post-Graduation program of Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Among the most important diseases that affect the bean crop is *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., the causal agent of anthracnose, which causes significant economic damage to producers worldwide. Among the most important factors that contribute to the spread of the pathogen is the use of contaminated seeds. Thus, this study aimed to evaluate biochemical defense responses in seedlings, when seeds were treated with molecules that have antimicrobial potential: Phenyl Se Citronelal and Phenyl S Citral, in three concentrations (g 100 mL<sup>-1</sup>): 0.25%, 0.50% and 1%, after artificially inoculated with *C. lindemuthianum* in osmotically modified medium. Disease transmission index, total chlorophyll and carotenoid contents, phenolic compounds, lignin derivatives (LATG), antioxidant metabolism, superoxide dismutase (SOD), Catalase, (CAT), ascorbate peroxidase (APX) activity were evaluated. Promising results were obtained, demonstrated by biochemical analysis, mainly in treatments with the Phenyl Se Citronelal molecule, a higher activity compared to the Phenyl S Citral molecule and the respective controls. In the same way, the enzyme activity linked to pathogenicity in vitro was evaluated, using specific solid means, to quantify the production index of amylase, lipase, protease, pectinase, cellulase, low effect of the products Phenyl Se Citronellal and Phenyl S citral in three different concentrations (g 100 ml<sup>-1</sup>): 0.25%, 0.0625% and 0.125% that do not completely inhibit the growth of the fungus in order to analyze its enzymatic production. Evaluating the presence of degradation halos, which when positive were measured to calculate the Enzyme Index (IE). As for the enzyme production, the isolate *C. lindemuthianum*, presented performances in four of the five enzymes in study, being the highest activity in the enzymes lipase and protease. It was concluded that the molecules are promising in inducing resistance in bean seedlings when the seeds are treated and in reducing the production of enzymes linked to pathogenicity by the fungus.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*. Phenyl Se Citronella. Phenyl S Citral. Enzyme activity. Antioxidant activity.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Índice da doença em plântulas de feijão a partir de sementes inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e logo tratadas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Inoc. Sem Molec (Sementes sem uso de molécula e inoculadas), Sadia (Sementes sadias). E0: Plântulas sem sintoma, E1: Plântulas com sintomas nos cotilédones, E2: Sintomas no caule ou nas folhas, E3: Sintomas em cotilédones e no caule ou folha, E4: Sintomas em cotilédones, caule e nas folhas, E5: Morte-pós emergência, E6: Morte-pré emergência. 32
- Figura 2 Concentração de clorofila total (CloT) em folhas de plântulas de feijão, onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). (n=5). 35
- Figura 3 Concentração de carotenoides (Car) em folhas de plântulas de feijão, onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), barras em cada ponto representam o erro padrão da média. (n=5). 37
- Figura 4 Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) em folhas de plântulas de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas),

Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). 39

Figura 5 Concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (DLATG) em folhas primárias de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). 41

Figura 6 Atividade específica da enzima Superóxido dismutase (SOD), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). 42

Figura 7 Atividade específica da enzima Catalase (CAT), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Semente sadia). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $n=5$ ). 45

Figura 8 Atividade específica da enzima Ascorbato peroxidase (APX), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S

Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. ( $p < 0.05$ ) ( $n=5$ ). 46

- Figura 9 Peroxidação lipídica pela quantificação do teor de malondialdeído (MDA) em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). ( $n=5$ ) 46
- Figura 10 Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares amilolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de cor claro. 50
- Figura 11 Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares celulolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de cor laranja claro. 52
- Figura 12 Acúmulo de sais em torno da colônia produzido por enzimas extracelulares lipase, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. 53
- Figura 13 Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares proteolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de aparência transparente. 55
- Figura 14 Não presença de halos de degradação para atividade pectinolítica 56

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escala de notas do índice de doença, avaliada através da soma de plântulas nos tratamentos que apresentasse as características descritas na tabela, após 12 dias de semeadura.....	22
Tabela 2 -Taxa de transmissão de <i>C. lindemuthianum</i> em plântulas de feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	34
Tabela 3 - Atividade enzimática Amilase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por difusão em substratos sólidos específicos A2 (Phenyl S Citral), A3 (Phenyl Se Citronelal)...	49
Tabela 4 - Atividade enzimática Celulase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por difusão em substratos sólidos específicos. ....	51
Tabela 5 - Atividade enzimática Lipases de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por difusão em substratos sólidos específicos. ....	53
Tabela 6 - Atividade enzimática Protease de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por difusão em substratos sólidos específicos. ....	54
Tabela 7 - Atividade enzimática Pectinase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> por difusão em substratos sólidos específicos. ....	55

## Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>15</b>
<b>2 Revisão de literatura</b>	<b>14</b>
<b>3 Material e métodos</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Estudo I: Uso de moléculas semissintéticas no controle de <i>C. lindemuthianum</i> associado a sementes de feijão</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Estudo II: Efeito de compostos semissintéticos na resposta bioquímica de plantas de feijão quando inoculadas com <i>C. lindemuthianum</i></b>	<b>23</b>
<b>3.2.1 Análise da atividade enzimática</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 Determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3 Peroxidação lipídica (MDA)</b>	<b>26</b>
<b>3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais e (DLATG)</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Estudo III: Efeito das moléculas e doses testadas na neutralização de enzimas ligadas a patogenicidade</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1 Delineamento experimental</b>	<b>30</b>
<b>4 Resultados e discussão</b>	<b>32</b>
<b>5 Conclusões</b>	<b>32</b>
<b>Referências</b>	<b>56</b>

## 1 Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas de maior importância e valor econômico em todo o mundo e é cultivado na maioria das regiões e diferentes climas. Considerado uma excelente fonte de proteína vegetal, importante na dieta humana, o qual é consumido pela maioria da população mundial, destaca-se o Brasil como o maior consumidor (McCONNELL *et al.*, 2010; BITOCCHI *et al.*, 2012). Produzido na maioria dos estados brasileiros, em diferentes épocas (CONAB, 2016), sendo os estados do Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, e Pernambuco responsáveis por 90% da produção de feijão nacional (CONAB, 2020).

Dentre os fatores que afetam a produtividade da cultura, destacam-se os causados pelas doenças, em sua maioria provocados por fungos fitopatogênicos, dentro deste grande grupo destaca-se o *C. lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Lams.-Scrib, agente etiológico da antracnose do feijão comum, sendo uma doença de grande importância econômica, reconhecida como uma das doenças fúngicas de maior gravidade, que ataca a parte aérea do feijão, afetando em maior parte cultivares suscetíveis (RAVA *et al.*, 1993; PADDER *et al.*, 2017). Em regiões onde as condições climáticas são favoráveis: temperaturas amenas de 13°C e 26°C, umidade relativa; acima de 91% e precipitação, podem ocasionar até 100% de perdas na cultura (BALARDIM; JAROSZ; KELLY, 1997; FERNÁNDEZ *et al.*, 2000).

O principal meio de sobrevivência e disseminação de *C. lindemuthianum* são as sementes, e no ponto de vista epidemiológico, sementes infectadas constituem a maior fonte de inóculo nas lavouras (AGARWAL, 1987; ALVES *et al.*, 2006). As sementes quando infectadas podem apresentar danos nos diferentes estádios da cultura no desenvolvimento inicial, podendo comprometer a qualidade fisiológica das sementes, ocasionando baixo estande de plântulas. Em estágios mais avançados pode causar a morte da planta (VIEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013; MIGLIORINI, 2018).

Práticas de manejo da doença incluem uma série de medidas, tais como a rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, uso de fungicidas sintéticos para tratamento de sementes e pulverização na parte aérea. No entanto, o uso sequencial

de fungicidas sintéticos pode levar à seleção de indivíduos resistentes a determinados grupos químicos (SINGH; SCHWARTZ, 2010; CRUZ *et al.*, 2014; TRABANCO *et al.* 2015). Assim, outras estratégias com o uso de medidas alternativas são importantes para reduzir os danos da doença.

Compostos do metabolismo secundário presentes no extrato bruto ou óleo essencial de citronela e capim limão podem desempenhar funções importantes no controle de fitopatógenos por meio da ação antimicrobiana direta, inibindo enzimas ligadas a patogenicidade do fungo (OLANDA, 2014); ou por meio da ativação dos mecanismos de defesa das plantas tratadas com a indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com característica de elicitores e ação fungitóxica (STANGARLIN *et al.*, 2011).

Substâncias de origem natural vêm sendo estudado por diferentes grupos de pesquisa dentro das áreas como a ciências farmacêuticas, alimentícias e agrária. A composição complexa de compostos pode apresentar atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante, inseticida. Porém, sua ação depende dos componentes majoritários nestes produtos. No geral, seu modo de ação pode provocar a inibição e a morte do microrganismo por romper a membrana celular, resultando na inibição do transporte de elétrons e afetando a translocação de proteínas, a fosforilação e outras atividades enzimáticas. Isto provoca a destruição da integridade da membrana celular, culminando com a morte microbiana (LENARDÃO *et al.*, 2015).

Em trabalhos conduzidos por Zabotti (2019), testando diferentes doses de Phenyl S Citral e Phenyl Se Citronelal, este verificou que as moléculas inibiram o desenvolvimento de *C. lindemuthianum in vitro*, e que as doses utilizadas nesse estudo (g 100 mL<sup>-1</sup>): 1%, 0,5%, 0,25%, não alteraram a qualidade fisiológica das sementes, surgindo como uma nova alternativa de controle.

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das moléculas (Phenyl S Citral e Phenyl Se Citronelal) na transmissão da semente plântula de *C. lindemuthianum* e os possíveis mecanismos de ação das moléculas semissintéticas na neutralização de enzimas ligadas à patogenicidade e por meio de indução de resistência.

## 2 Revisão de literatura

No contexto mundial e nacional o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.s) está inserido economicamente como um dos principais produtos agrícolas, é a leguminosa de maior importância socioeconômica no mundo. O feijão é produzido em distintas regiões brasileiras e em diferentes sistemas de produção. É um dos principais constituintes da dieta dos brasileiros, pelo fato de ser uma excelente fonte de proteína, carboidratos, fibras, vitaminas, minerais e energia (LOVATO *et al.*, 2018). Sendo consumidas anualmente em torno de 17 milhões de toneladas, com produção que atinge 30,4 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019).

O Brasil desponta como grande produtor de feijão, ocupando o terceiro lugar na produção mundial e o segundo maior consumidor (21%) (FAOSTAT, 2019), estando dentro do aumento de 8% na produção de grãos na safra 2020/21 (CONAB, 2021), estimando-se em torno 3,1 milhões de toneladas de grãos na safra 2020/2021. Atende assim, uma produção de 516,8 mil toneladas de feijão-comum preto (CONAB, 2021). Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Goiás, principais estados produtores, concentram quase 70% da produção de grãos do país (CONAB, 2020).

A região Sul do Brasil é a maior produtora do grão, responsável por cerca de 94% da produção nacional. Aproximadamente 587 mil toneladas são produzidas no Paraná, 127 mil toneladas em Santa Catarina e 1082 mil toneladas no Rio Grande do Sul (CONAB, 2018). Em termos econômicos, o feijão representa significativa fonte de renda principalmente para a agricultura familiar, a qual é responsável por 60% da produção nacional (CTSBF, 2012).

Um fator determinante no sucesso produtivo é a utilização de uma semente de qualidade a qual está determinada pela somatória dos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários. A qualidade sanitária da semente é de suma relevância, pois as sementes são um importante meio de disseminação, sobrevivência e transmissão do patógenos. Através das sementes pode ocorrer a introdução do patógeno em áreas isentas, bem como a introdução de raças mais agressivas e de maior inóculo em áreas já infestadas. A quantidade de inóculo inicial associado às sementes pode constituir focos primários de infecção no cultivo e, conseqüentemente, reduzir a qualidade fisiológica do produto, além de influenciar na epidemia das doenças (GADAGA, 2017; DANIELLI *et al.*, 2011, PEREIRA, 2018).

A gravidade da doença depende em grande parte das condições climáticas. A doença é mais acentuada em anos, com alta umidade relativa do ar, precipitação frequente e temperaturas moderadas. Quando aliados a estes fatores, propícios ao desenvolvimento da doença e a suscetibilidade das várias cultivares em uso, os danos gerados pelo fungo podem ocasionar perdas de até 100% da produção (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; LENÉ, 1992; BALARDIN, 1997; MARTINS *et al.*, 2019).

Cabe destacar que a maioria das doenças de importância econômica na cultura do feijão são causadas por patógenos transmitidos pelas sementes. Dentre eles o agente causal da antracnose o *C. lindemuthianum*, que merece destaque por ser um dos fitopatógenos de maior importância econômica. O *C. lindemuthianum* produz micélio septado e ramificado, de coloração hialina a quase negra, à medida que envelhece. Os conídios são hialinos, unicelulares, podendo ser oblongos, cilíndricos, com pontas arredondadas ou uma delas pontiaguda, medem de 2,5-5,5 × 11-20 µm e podem apresentar área clara semelhante a um vacúolo central. A massa de esporos formada nos acérvulos possui coloração rósea ou salmão. Os conidióforos são hialinos, eretos, sem ramificações, com comprimento de 40 a 60 µm. A fase sexuada *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* dificilmente se desenvolve em condições de campo. Entretanto, esta fase é considerada responsável por proporcionar alta variabilidade ao patógeno, devido as diferentes combinações alélicas, resultantes de mutações (BIANCHINI *et al.*, 2005; DARBEN, 2010).

O agente causal sobrevive em restos culturais, no próprio hospedeiro ou em outras plantas hospedeiras. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, a ação do patógeno é favorecida pela alta umidade, principalmente quando há chuvas abundantes. Temperaturas entre 22°C e 27°C favorecem a produção de esporos. Em períodos de temperaturas mais baixas, a importância da doença diminui, sendo pequena a sua incidência nos meses de inverno, mesmo que ocorram chuvas (PADDER *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

A Antracnose é uma doença que pode afetar todos os estádios fenológicos da cultura do feijão e todas as partes da planta. Os sintomas da doença podem ocorrer em toda a parte aérea da planta, afetando cotilédones, caule, folhas, pecíolos, vagens e sementes, provocando a morte da planta (KIMATI, 1980; GALLI *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2016). Quando o *C. lindemuthianum* é transmitido por sementes, geralmente sintomas podem ser observados logo após a germinação, pode ocorrer apodrecimento antes da emergência (morte pré-emergente), e até mesmo morte pós-

emergente provoca lesões necróticas de cor escura, deprimidas nos cotilédones, e pode levar a morte das plântulas e plantas (GALLI *et al.*, 2005).

A patogenicidade do fungo está relacionada com o mecanismo de ação adotado pelo patógeno, como a produção de toxinas e enzimas. As enzimas produzidas pelos fungos fitopatogênicos cumprem uma importante função na infecção do hospedeiro (CARDOSO *et al.*, 2009). O processo de infecção dependerá da potencialidade do fungo de produzir enzimas extracelulares capazes de degradar compostos produzidos pela planta, sendo que o perfil enzimático é inter ou intraespecificamente variável (MARTINEZ *et al.*, 2009), facilitando a disseminação do patógeno nos tecidos dos hospedeiros (KIKOT *et al.*, 2009). Dentre as enzimas que formam parte do arsenal enzimático no processo de patogênese destacam-se: pectinases, lipase, cutinases, celulases, amilase, proteases, dentre outras (LIMA FILHO *et al.*, 2003; DI PIERO; PASCHOLATI, 2005).

Estas enzimas hidrolíticas extracelulares são conhecidas como degradantes de polímeros estruturais das paredes e membranas celulares, facilitando a disseminação do patógeno nos tecidos dos hospedeiros (KIKOT *et al.*, 2009). Podem ser produzidas em grande quantidade durante a infecção, facilitando a colonização, penetração, extração de nutrientes e ainda afetar as reações de defesa da planta (PASCOLATTI, 1995). Como por exemplo, enzimas amilolíticas ou amilases que promovem a degradação do amido que é o principal polissacarídeo de reserva nas células vegetais e que pode ser utilizado como fonte de energia durante o crescimento e/ou esporulação, as proteases, enzimas que clivam as ligações peptídicas nas proteínas e a degradação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, as pectinases que quebram substâncias pecticas componentes mais abundantes presentes na parede celular. No entanto, é importante mencionar, que através da caracterização enzimática pode possibilitar a diferenciação de isolados (LEBEDA *et al.*, 2001; ALCONADA, 2009; ONOFRE *et al.*, 2011; PASCHOLATI, 2011).

Enquanto o sistema de defesa vegetal atua de maneira dinâmica e coordenada ao momento do processo de infecção pelo patógeno, ou mesmo por uma indução à resistência mediante a utilização de produtos com esta capacidade, podem ser ativados mecanismos estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós formados no mecanismo estrutural que constituem barreiras físicas. Já na bioquímica envolvem substâncias com a capacidade de evitar a tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro e inibir o desenvolvimento do mesmo, gerando condições adversas para

a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. As concentrações presentes devem ser adequadas no local de invasão. Esta reposta pode variar tanto de hospedeiro suscetível para resistente (PASCHOLATI; LEITE, 1994; VANITHA *et al.*, 2009).

Trabalhos têm demonstrado em diversos patossistemas a existência de uma correlação da defesa da planta a fitopatógenos com o aumento na expressão de enzimas antioxidantes (MESSIAS, 2008; HE *et al.*, 2011). Devido à ação dos patógenos e seus mecanismos de infecção está diretamente associada aos processos de resposta hipersensível, ligados a formação de substâncias reativas de oxigênio (ERO) e alterações nas características estruturais da planta (SEPÚLVEDA *et al.*, 2005; TAMARGO *et al.*, 2012). Devido a isto, a planta possui um complexo mecanismo antioxidante que pode ser enzimático e não enzimático, como ser carotenoides, vitaminas, compostos fenólicos, peroxidase de fenóis, (POX), super óxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), fenilalanina amônia-liase (PAL), que irão atuar em relação as espécies reativas de oxigênio, e que exercem um papel muito importante de resistência ao ataque dos patógenos (SINCLAIR, 1991; TAIZ; ZEIGER, 2004, WAR *et al.*, 2013; NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

Para o controle ou manejo de doenças em plantas, pesquisas vêm sendo realizadas procurando alternativas eficientes que substituam o uso indiscriminado de produtos químicos, pretendendo evitar danos ao ambiente, problemas de saúde humana, e beneficiar na variabilidade do patógeno levando ao surgimento de raças que apresentaram resistência aos produtos utilizados (KUHN, 2007).

Um conjunto de estratégias de controle a fim de reduzir o inóculo pode ser empregado no controle da antracnose, tais como a rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, tratamento das sementes, estabelecimento de tolerância do nível de sementes infectadas, produção de sementes em áreas livres de doença, procedimentos sanitários e aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2007; LAMICHHANE *et al.*, 2017).

O tratamento de sementes vem sendo uma estratégia muito implementada visando o controle dos patógenos que são transportados e transmitidos pelas mesmas. Além de tentar eliminar o que poderia ser um potencial inóculo primário, procura-se uma proteção da plântula contra outros possíveis microrganismos patógenos que possam estar presentes no solo (MACHADO, 1986; REY *et al.*, 2009; GADAGA, 2017), e até poder contribuir na melhora da germinação e emergência da plântula (ELLIS; GALVEZ, 1980). No entanto, produtos químicos têm sido usados para

a proteção destas, mas apesar de seus resultados 'positivos' trazem desvantagens como elevados custos de produção, problemas com a saúde das pessoas e contaminação ambiental (TALAMINI; STADNIK, 2004).

Produtos derivados de vegetais são intensivamente estudados quanto à eficácia no controle alternativo de doenças de plantas, para uso em sistemas de produção, pretendendo a redução do uso de agrotóxicos (CARNEIRO, 2003; FIORI *et al.*, 2000).

Dentre as plantas medicinais e aromáticas amplamente utilizadas, encontra-se a citronela (*Cymbopogon sp*), planta originária do Ceilão e da Índia. O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae, constituído de oitenta e cinco espécies. A citronela possui na sua composição alto teor de citronelal, geraniol e citronelal, destacando entre eles o citronelal. Apresentando atividade antisséptica, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos e bactérias. A citronela é utilizada como material básico para a síntese de importantes compostos bioativos (CRAVEIRO *et al.*, 1981; CASTRO *et al.*, 2010). E também o capim-limão (*Cymbopogon citratus (DC.) Stapf*) gramínea perene de origem asiática (Índia), o qual tem sido amplamente estudado, pois apresenta atividade antifúngica, antibacteriana, anti-helmíntica, inseticida, diurética e anticarcinogênica (CASTRO *et al.*, 2010).

Compostos do metabolismo secundário presentes em extrato de citronela e citral podem desempenhar funções importantes no controle de fitopatógenos por meio da ação antimicrobiana direta ou por meio da inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos (OLANDA, 2014). É com base nestas informações que, técnicas para a síntese e modificação química de compostos naturais vêm sendo aplicados para obtenção de substâncias com propriedades benéficas em diversas áreas, onde estudos relatam no uso e controle contra microrganismos. A modificação destes componentes pode permitir a melhoria das atividades biológicas apresentadas pelas moléculas naturais e não modificadas (CHAKRAVORTY, 2012). Estes compostos podem ser usados contra um amplo espectro de espécies de microrganismos (ANTUNES; CAVACOB, 2010). Devido a composição destas moléculas, o modo de ação pode provocar inibição e/o morte dos patógenos, envolvendo diferentes mecanismos, onde todos os componentes da célula tornam-se possíveis alvos de atuação desses compostos em geral (ABREU; NERY, 2015).

Além disso, a adição de um elemento químico sintético à estrutura do componente majoritário de um óleo essencial pode aumentar seu desempenho. Neste

caso, o selênio (Se), utilizado como elemento adicionado a estes compostos, não é considerado um nutriente essencial para as plantas superiores, mas desempenha um papel benéfico, especialmente em reduzir estresses abióticos e retardar o processo de senescência nas plantas, dentre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2016; MONDO *et al.*, 2016; RUFINO *et al.*, 2017) e o (S) enxofre, elemento que apresenta importantes qualidades para a biossíntese de compostos antimicrobianos responsáveis pela proteção das plantas ao ataque de patógenos, podendo atuar na resistência das plantas a diferentes doenças (FORNEY *et al.*, 2010; BAYOUMI *et al.*, 2018).

A exploração da atividade biológica destas novas moléculas semissintéticas pode constituir uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas. Porém, pouco se sabe sobre sua eficiência no controle de fitopatógenos de importância agrícola. Bem como, a melhor forma de aplicação destes nos cultivos agrícolas, se é via pulverização ou tratamento das sementes, ainda não está definida e requer mais estudos. No entanto, o tratamento de sementes é uma das formas ambientalmente mais eficiente no controle de patógenos, visto a pequena quantidade de produto que é liberado no meio, além de que, algumas moléculas modificadas podem conter elementos que melhoraram o desempenho inicial da cultura conferindo à planta condições de defesa (AGUIAR *et al.*, 2018).

Diante do exposto, é relevância verificar a capacidade de novas moléculas químicas em neutralizar o arsenal enzimático, ligados a patogenicidade, produzidas pelo fungo, durante o processo de desenvolvimento da doença, bem como verificar a possibilidade de indução de resistência, a partir do uso de novas moléculas em plantas de feijão.

### 3 Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes/Fungos Fitopatogênicos (PLSFF) e no Laboratório de Interação Planta-Patógeno (LIPP) na Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPeI), no Município de Capão do Leão - RS.

As moléculas utilizadas pertencem ao Laboratório de Química Orgânica – UFPeI, derivadas dos óleos de citronela (*Cymbopogon nardus*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e modificadas quimicamente quanto a sua estrutura, Phenyl S Citral, Phenyl Se Citronelal. O isolado fúngico *C. lindemuthianum* raça 86 pertence à coleção do LPSFF, FAEM-UFPeI. O isolado foi coletado no estado do Rio Grande do Sul. O cultivar de feijão utilizado foi 'BRS Valente', variedade suscetível à antracnose. As sementes foram previamente analisadas quanto a qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote de acordo com as RAS (BRASIL, 2009) para continuidade dos ensaios.

#### 3.1 Estudo I: Uso de moléculas semissintéticas no controle de *C. lindemuthianum* associado a sementes de feijão

Para verificar o efeito das moléculas no controle do *C. lindemuthianum* associados as sementes de feijão foi avaliado mediante uma escala de nota, a severidade dos sintomas nas plântulas aos doze dias após semeadura, considerando-se a porcentagem de plântulas emergidas com sintomas, plântulas emergidas sem sintomas, bem como sementes mortas. Para isso, sementes de feijão inoculadas com o fungo *C. lindemuthianum* e logo tratadas com as moléculas: Phenyl S Citral, Phenyl Se Citronelal nas concentrações (g 100 mL<sup>-1</sup>): 1%, 0,5%, 0,25%. Foram semeadas em copos de 8x5 cm diâmetros contendo como substrato vermiculita e acondicionadas em câmara de crescimento a temperatura de 23°C a foto período de 12 horas luz, com irrigação manual sempre que necessário. Posteriormente, as plântulas foram avaliadas utilizando uma escala descritiva de severidade. Com base nos sintomas observados, as plântulas foram separadas em diferentes níveis conforme abaixo descritivas de severidade (ID):

Tabela 1 - Escala de notas do índice de doença, avaliada através da soma de plântulas nos tratamentos que apresentasse as características descritas na tabela, após 12 dias de semeadura.

Escala	Característica
E0	Plântulas sem sintomas
E1	Plântulas com sintomas nos cotilédones
E2	Sintomas no caule ou nas folhas
E3	Sintomas em cotilédones e no caule ou folha
E4	Sintomas em cotilédones, caule e nas folhas
E5	Morte-pós emergência
E6	Morte-pré emergência

Fonte: Adaptada de Gaviria-Hernández *et al.* (2020).

Os valores obtidos na escala de severidade foram utilizados para calcular o índice da doença a partir de notas de severidade (0 a 6), índice de doença -ID (%), taxa de transmissão TT (%). Para o cálculo do índice da doença das plântulas utilizou-se a fórmula estabelecida por Mckinney (1923):

Índice de doença (ID): a ocorrência da antracnose foi avaliada após 12 dias de semeadura.

$$ID \sum \frac{(F.V)}{n.x} \times 100$$

Onde: ID = Índice de doença (%); f = número de plantas com determinada nota; v = nota observada; n = número total de plantas avaliadas e x = grau máximo de infecção. Os resultados foram expressos em porcentagem de infecção por *C. lindemuthianum*.

$$T.T(\%) = T.I(\%) \times 100 / I.S(\%)$$

Em que: T.I = taxa de infecção em plantas de feijão com sintomas de *C. lindemuthianum*; e I.S = incidência da doença em sementes inoculadas artificialmente.

### 3.2 Estudo II: Efeito de compostos semissintéticos na resposta bioquímica de plantas de feijão quando inoculadas com *C. lindemuthianum*

Para verificar o efeito das diferentes moléculas semissintéticas na indução de resistência das plantas de feijão, foram avaliadas as seguintes atividades bioquímicas: Análise da atividade enzimática, determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos, peroxidação lipídica e a determinação de compostos fenólicos totais.

Para a realização das análises foi feita a inoculação artificial das sementes (condicionamento osmótico) descrita por Rey *et al.* (2009). Foram inoculadas artificialmente as sementes de feijão cultivar BRS Valente, para isso, discos de 5mm de meio BDA contendo micélio do fungo foram transferidos para quatro pontos equidistantes das placas de Petri - 9cm de diâmetro, contendo meio BDA modificado com sacarose a -1,0 Mpa, evitando a germinação das sementes durante o processo de inoculação. Posteriormente, as placas foram incubadas por 10 dias a uma temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 12 horas luz.

Passado o período de incubação foi depositado sob as colônias fúngicas 50 sementes de feijão, previamente desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1%, distribuídas aleatoriamente sobre as placas e levemente prensadas sobre o meio colonizado pelo fungo, e novamente incubadas por 96 horas. Posteriormente, foram retiradas das placas e lavadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 1% e três vezes em água destilada e secadas a temperatura ambiente por 48 horas.

Nas testemunhas, as sementes ficaram em contato com placas de Petri, contendo apenas o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) osmoticamente modificado com sacarose. O período de incubação foi de 96 horas.

Posteriormente, foi realizada a avaliação de sanidade das sementes através do *Blotter test* (BRASIL, 2009b), sendo então, confirmada a infecção das sementes obtendo-se 100% de incidência. Após o preparo dos lotes procedeu-se o tratamento das sementes com as moléculas semissintéticas: Phenyl S Citral, Phenyl Se Citronelal. As concentrações utilizadas no estudo 1 e 2 (g 100 mL<sup>-1</sup>): 1%, 0,5%, 0,25% previamente testadas em estudos anteriores (ZABOTT, 2018) e para o estudo 3: 0,0625%, 0,125%, 0,25%.

O processo de tratamento foi realizado manualmente em sacos plásticos de polietileno. Para tal, adicionou-se o composto seguido de água destilada em relação de 0,5 ml de produto por 1.5ml de água para preparo da calda, para obtenção das

doses. Posteriormente, homogeneizou-se a suspensão e, em seguida, foram adicionados 0,04kg de sementes, seguido de agitação manual dos sacos por 2min. até que o produto ficasse completamente aderido à semente. Os sacos contendo as sementes tratadas foram abertos e as sementes colocadas para secar a temperatura ambiente por 48h. No tratamento testemunha, as sementes foram tratadas com água destilada esterilizada.

As sementes inoculadas e tratadas com as moléculas semissintéticas foram semeadas em copos plásticas de 8x5 cm, contendo substrato comercial (substrato para plantas Carolina soil) + vermiculita, previamente autoclavado, mantidas em sala acondicionada, à temperatura de 23 °C, com irrigação manual sempre que necessário.

Para as análises bioquímicas foram realizadas coletas da parte aérea da planta (das folhas de feijão) aos 15 dias após semeadura. No entanto, imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas em N<sub>2</sub> e logo armazenadas em ultra freezer (- 80 °C) até a realização das análises, mantendo-se assim sua integridade.

### **3.2.1 Análise da atividade enzimática**

Os extratos vegetais para a quantificação das atividades enzimáticas foram obtidos conforme a metodologia descrita em Dallagnol *et al.* (2011) com algumas modificações. Para tal, amostras de tecido foliar de 0,5g foram maceradas em N<sub>2</sub> para obtenção do extrato foliar. Seguido da adição da solução de extração, constituída de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,8), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (1 mM) e polivinilpolipirrolidona (40 mg). Em seguida, esse material foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. Sendo o sobrenadante utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

Foram determinadas as seguintes atividades enzimáticas: Superóxido Dismutases (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato peroxidase (APX).

A atividade da enzima superóxido dismutases (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) conforme metodologia de Ribeiro *et al.* (2014), em um meio de reação contendo 1.000 µL fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), 400 µL metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM, riboflavina 0,2 µM, 390 µL água destilada e 30 µL de amostra foram iluminados por 7 minutos com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. As leituras foram realizadas a 560 nm. A

unidade da SOD, correspondeu à quantidade da enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT, nas condições do ensaio, sendo os resultados expressos em unidades de SOD mg<sup>-1</sup> de proteína (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

A atividade da enzima catalase (CAT) foi definida através quantificação da degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AZEVEDO *et al.*, 1998). O meio de reação foi composto por 1.500 µL do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (2,5 µL.mL<sup>-1</sup> do tampão de reação) e 25 µL de amostra. As leituras foram realizadas a 240 nm e os resultados expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada por meio da quantificação colorimétrica da liberação de 'pnitrophenyl' clivado do substrato análogo da quitina 'p-nitrophenyl-β-D-N,N'- diacetylchitobiose' (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A mistura de reação, foi incubada a 37°C por 2 horas, contendo 200 µL do tampão de reação acetato de sódio 50 mM pH 5,0, 5 µL da solução de substrato pnitrofenil- β-D-N,N'-diacetilquitobiose (PNP) 2 mg mL<sup>-1</sup> e 45 µL da amostra. Após esse período, foram acrescentados 250 µL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,2 M. Posteriormente, a absorbância foi em espectrofotômetro a 410 nm, em um ensaio colorimétrico em espectrofotômetro (Bel®, modelo UV-UM51).

Para o cálculo da atividade subtraiu-se o valor de absorbância de cada amostra, do valor de absorbância do controle (uma mistura idêntica à da reação, contudo, a adição do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> realizada imediatamente após a adição do extrato vegetal). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 0,007 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (HARMAN *et al.*, 1993), sendo a QUI expressa em mM de 'p-nitrophenyl' produzido por min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. Determinação da concentração de aldeído malônico (MDA): Realizada conforme descrito por Cakmak e Host (1991) tendo os valores expressos em µmol de MDA kg<sup>-1</sup> de MF.

A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford, sendo determinadas a partir da ligação de aminoácidos com coomassie brilliant blue G-250 e os métodos foram calibrados utilizando uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada ao comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro, e o resultado expresso em µg proteínas mg<sup>-1</sup> de massa foliar (MF) (BRADFORD, 1976).

### 3.2.2 Determinação da concentração dos pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofilas e de carotenoides totais foram determinados com amostras de 0,5 g, maceradas em um almofariz em presença de 5 mL de acetona a 80% (v/v). O material foi centrifugado a 2.000 *rpm* por 3 minutos e o sobrenadante transferido para balão volumétrico de 20 mL, completando-se esse volume com acetona a 80% (v/v) metodologia proposta por Dallagnol *et al.* (2011). Os teores de clorofila *a*, *b*, totais (*a+b*) e de carotenoides totais serão calculados pelo uso das fórmulas de Lichtenthaler (1987) a partir da absorbância da solução obtida por espectrofotometria a 647, 663 e 470 nm. Os resultados são expressos em mg g<sup>-1</sup> de MF.

### 3.2.3 Peroxidação lipídica (MDA)

Os danos celulares nos tecidos foram determinados em termos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por Health e Packer (1968). Para isso, 0,2 g de amostra foram macerados com nitrogênio líquido e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) se transferiu para tubos de eppendorf e centrifugadas a 14000 *rpm* por 20 minutos a 4°C. Para a quantificação alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) em ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a 90°C por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos. A absorbância foi lida a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM cm<sup>-1</sup> e os resultados foram expressos em nM MDA g<sup>-1</sup> de MF.

### 3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais e (DLATG)

A quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais (CFST) e derivado de lignina-ácido tioglicólico (DLATG) foi realizada de acordo com método descrito por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Para a etapa de extração foram pesados 2g de amostra, as quais foram macerados em almofariz e pistilo com auxílio de nitrogênio líquido, depois de macerados se pesou na balança de precisão 0,1 g de

amostra (anotando os valores resultantes), diluídos em 1,5 mL de metanol 80% (v/v) e colocados em eppendorfs. Em seguida passou-se para a mesa agitadora a 200 rpm por 12 h a temperatura de 25 °C. Posteriormente, o extrato metabólico foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo.

Pelo método de Zieslin e Bem-Zaken (1993), com modificações, foi determinado os CFSTs. Um volume de 0,75µL do reagente Fenol Folin-Ciocalteu (0,25N) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil); 0,75µL do extrato metabólico; 0,75µL de carbonato de sódio (1M), mais 1,5mL de água destilada foram utilizados para o extrato metabólico de folha. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 725nm (Bel® modelo UV-UM51). Os resultados foram expressos em µg de CFST g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

O resíduo alcoólico-insolúvel seco, obtido após a extração dos CFSTs, que continha lignina e ácidos fenólicos associados à parede celular, foi utilizado para a determinação da concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (DLATG), de acordo com a metodologia proposta por Barber e Ride (1988).

Para tanto, o resíduo seco foi homogeneizado com 1,5mL de água destilada e centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos; após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, colocado em estufa a 65°C por 24h. O resíduo seco foi reidratado com 1,5mL de solução ácido tioglicólico e HCl a 2 N (1:10), agitado levemente e depois colocados 54 em banho-maria por 4h a 100°C. Em seguida, os eppendorfs foram colocados por 10 minutos em gelo (4°C).

Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água destilada e centrifugado novamente a 12.000 rpm durante 10 minutos. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1,5mL de NaOH a 0,5N. Em temperatura ambiente, a mistura permaneceu por 12h em mesa agitadora (200rpm), sendo que transcorrido este período, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante, adicionou-se 200µg de HCl concentrado, sendo os tubos transferidos para a geladeira, onde permaneceram por 4h, para que ocorresse a precipitação dos derivados da DLATG. Após, realizou-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado dissolvido em 2mL de NaOH a 0,5N.

Em espectrofotômetro, a 280nm, foi medida a absorvância dos derivados da DLATG e a concentração expressa em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de MF, utilizando uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de lignina alcalina, éter 2-hidroxipropil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Os dados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). Os efeitos de moléculas e de doses foram avaliados pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e a comparação com a testemunha realizada pelo teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ ). A presença de correlações entre as variáveis dependentes do estudo foi analisada através do coeficiente de correlação de Pearson. Software estatísticos utilizados para o análises de dados (SISVAR e INFOSTAT).

### **3.3 Estudo III: Efeito das moléculas e doses testadas na neutralização de enzimas ligadas a patogenicidade**

Para avaliação do índice enzimático em meio sólido específico foram utilizadas doses das moléculas que não inibiram completamente o desenvolvimento total do fungo (0,0625%, 0,125%, 0,25%) para permitir o crescimento do fungo e poder observar a produção de enzimas. Para isso, uma alíquota de 100 $\mu\text{L}$  das diferentes moléculas e concentrações foi misturada junto ao meio BDA fundido e homogeneizado, em seguida vertidos 10 mL em placas de Petri, sendo realizadas cinco repetições por tratamento. Como testemunha foi utilizado o fungo crescido em meio sem adição de molécula e DMSO. Para isso, discos (5mm de diâmetro) do isolado de *C. lindemuthianum* foram repicados para placas de Petri contendo cada um dos meios descritos para cada enzima.

As placas foram mantidas em BOD. Foram realizadas as medições dos diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo de degradação do substrato. Foram avaliadas as enzimas amilase, celulase, lipase, protease e pectinase.

Para a avaliação da atividade da enzima amilase *in vitro* foi utilizado (6 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{FeSO}_4$ ; 0,01 g de  $\text{ZnSO}_4$  e 15 g de Agar, 10 g de amido, 1 L de água destilada, pH: 6,8). Após o período de incubação, foi adicionado a cada placa de Petri 2 mL de solução lugol sobre a superfície do meio de cultura. Após 5 minutos, foi descartada a solução lugol,

e no caso de atividade amilolítica, foi observado a formação de um halo ao redor da colônia em contraste ao meio escurecido.

Para a atividade da enzima celulase *in vitro* os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio ágar carboximetilcelulose 1% (1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,5 g de asparagina, 0,5 g de KCl; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 g de extrato de levedura; 10 g de carboximetilcelulose, 20 g de agar-agar, 1 L de água estilada), conforme metodologia descrita por Pereira (2009). As placas com as colônias foram incubadas em BOD a 25 C, e após 5 dias, as placas com os isolados foram submetidas a choque térmico por 16 horas a 50°C.

Posteriormente, foi adicionado 10 mL de solução vermelho de congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1M, pH 8 por 30 minutos. Passado o tempo, a solução foi descartada e as colônias forma lavadas com 5 mL de solução NaCl 0,5 M no mesmo tampão. A atividade da celulase foi feita pela observação de um halo claro ao redor da colônia, referente à degradação da celulose ao redor da colônia (MULLINGS, 1985). As medições foram realizadas conforme descrito no item.

A determinação da atividade lipolítica foi adaptada de Hankin e Anagnoskis (1975). Os isolados do fungo foram repicados em meio ágar contendo 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 20 g ágar; 0,01g rodamina; 10 mL Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 6,0. O fungo foi incubado por 8 dias 25°C com fotoperíodo 12h luz e, posteriormente, foi colocado a 4°C por 48 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi observada mediante a presença do halo ao redor da colônia, formado por cristais de sais de cálcio decorrentes da liberação da enzima lipolítica.

Para detectar a atividade proteolítica, os isolados foram cultivados em meio nutriente ágar, contendo gelatina como substrato (5g de peptona; 3g de extrato de carne; 15g de ágar; 40g de gelatina; 1000 mL de água destilada; pH 6,0) (CRUZ 1985) e permaneceram a 25 °C sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Decorridos o período de cultivo dos isolados no meio, a revelação do halo de degradação ocorreu por meio da adição de 2 mL de solução saturada de sulfato de amônio (77g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 100 mL de água destilada).

Para avaliar a atividade de pectinases foi utilizado o meio 500 mL de solução mineral (2,0 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ; 4,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,0001 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,0001 g de  $\text{MnSO}_4$ ; 0,0007 g de  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,0005 g de  $\text{CuSO}_4$ ; 0,0001 g de  $\text{MoO}_3$ ) + 500 mL de solução pectina (1 g de

extrato de levedura; 15 g de ágar; 5 g de pectina cítrica). O meio teve pH ajustado para 7,0. Conforme metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações. As colônias foram incubadas em BOD por cinco dias a 25 °C, no escuro. Após esta etapa, foi aplicado 5 mL de vermelho de metila 2% (0,2 g de vermelho de metila; 60 mL de etanol 95% e; 40 mL de água destilada), com dez minutos a solução foi descartada e a avaliação foi feita pela observação de um halo formado por uma região translúcida ao redor da colônia.

Para todas as enzimas mencionadas anteriormente foi quantificada por meio da análise da relação H/C, obtida pela divisão da média do diâmetro do halo (H) nas quatro repetições pela média do diâmetro da colônia (C).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homoscedasticidade pelo teste de Hartley. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ( $p \leq 0,05$ ). Constatou-se significância estatística, as relações H/C de cada isolado foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2000).

### **3.3.1 Delineamento experimental**

No estudo I, II e III o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (2x3), constituído de duas moléculas semissintéticas Phenyl S Citral, Phenyl Se Citronelal e três concentrações ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ): 1%, 0,5%, 0,25%, com 30 repetições no estudo I e II, no entanto, no estudo III foram cinco repetições e três diferentes concentrações ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ): 0,25%, 0,0625% e 0,125%. As análises estatísticas foram realizadas no programa INFOSTAT e SISVAR. As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas à análise de teste de Tukey a 5%.

#### 4 Resultados e discussão

Na interação *C. lindemuthianum* e sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) quando tratadas com os compostos semissintéticos, foi observada diferença entre as moléculas. A molécula Phenyl S Citral nas três concentrações avaliadas (g 100 mL<sup>-1</sup>): (0,25%, 0,5% e 1%) apresentou maior comprometimento no estabelecimento inicial da plântula, provocando maior número de mortes pré e pós emergência. Também foi observado crescimento micelial do fungo e a formação de acérvulos nos cotilédones, sendo obtido um índice de doença (ID) entre 42-49%. Por outro lado, na molécula Phenyl Se citronelal, esses eventos se apresentaram em menor escala, percebendo menor dano conforme aumentava a concentração da molécula. Na figura. 1, observa-se que as plantas menos afetadas foram as provenientes de sementes tratadas com a concentração de 1%, obtendo o menor ID de 21%, seguidos pelas concentrações 0,50% e 0,25% da mesma molécula obtendo valores de ID de 35-37%.

Pode-se observar também na figura. 1, que o desvio padrão aumenta de acordo com as cores atribuídas em cada escala do índice de doença ID (Tabela 1) em relação ao número total de plantas em cada um dos tratamentos e controle. As barras com maior comprimento são as laranjas em referência à nota de escala E1 (Plântulas com sintomas nos cotilédones), o qual foi o sintoma mais apreciado no estudo, encontrado em todos os tratamentos, obtendo maiores porcentagem nos tratamentos com citronelal ao 0,25%, 0,50% e na molécula citral ao 0,25%. Em média, 10% das plantas dentro de todos os tratamentos apresentaram sintomas na folha e/ou no caule (E3).

Quanto as mortes em pré-emergência (E6), a maior porcentagem foi observada nos tratamentos com a molécula Phenyl S Citral, na concentração de 0,50% semelhante ao tratamento controle, sementes inoculadas com o *C. lindemuthianum* e sem molécula. A porcentagem de mortes de plântulas na pós-emergência (E5) foi semelhante em todas as concentrações para a molécula Phenyl S citral, no Phenyl Se Citronelal na concentração de 0,25% e no controle sementes inoculadas sem tratamento com moléculas. Contudo, morte pré-emergente e danos no cotilédone foram os principais sintomas observados nesse estudo.

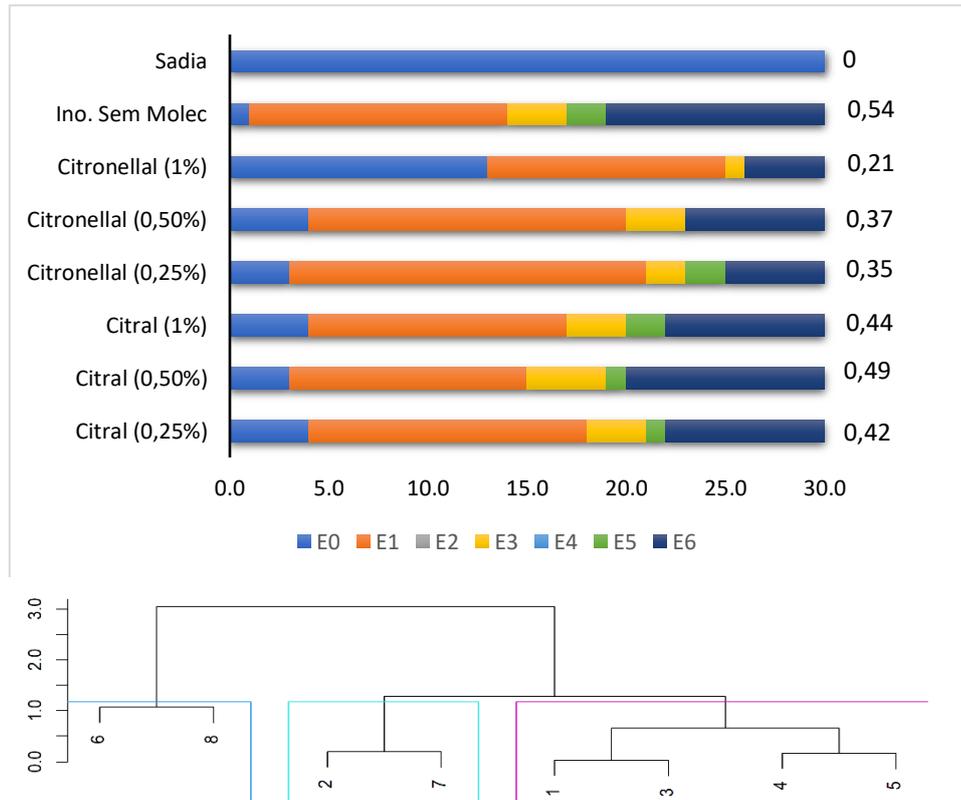


Figura 1 - Índice da doença em plântulas de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e logo tratadas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Inoc. Sem Molec (Sementes sem uso de molécula e inoculadas), Sadia (Sementes sadias). E0: Plântulas sem sintoma, E1: Plântulas com sintomas nos cotilédones, E2: Sintomas no caule ou nas folhas, E3: Sintomas em cotilédones e no caule ou folha, E4: Sintomas em cotilédones, caule e nas folhas, E5: Morte-pós emergência, E6: Morte-pré emergência.

Fonte: Pinel (2021).

Sabe-se que a germinação das sementes é uma das fases mais importantes do desenvolvimento das culturas, pois, fatores como as doenças transmitidas por sementes podem interferir ou afetar a emergência. Assim, processos de recobrimento das sementes de feijão com diferentes fontes e doses de substâncias com propriedade antimicrobiana podem influenciar no ciclo de infecção de patógenos, o que pode ser uma alternativa, uma vez que proporciona proteção. Vários trabalhos vêm sendo conduzidos com tratamento alternativo para controle de patógenos em sementes; a exemplo, tem-se os estudos realizados por Paiva *et al.* (2017) que relatam que o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (citronela) foi eficaz no tratamento de semente de feijão no controle do fungo *Aspergillus* sp. Resultados semelhantes foram obtidos por Veloso (2016) controlando efetivamente *Curvularia* sp. Lozada (2019) verificou que o uso de óleos essenciais citronela e citral podem proporcionar uma proteção em

sementes de cebola e inibir totalmente a infecção do *C. gleosporoides*, atribuindo às moléculas que se encontram em maior concentração. Resultados positivos sobre o óleo de capim-limão (cital) tem sido relatado por Bankole e Joda (2004) que obtiveram controle do *Aspergillus flavus* quando inoculadas sementes de feijão e milho e logo tratadas com o óleo essencial. Ao igual, que a avaliação do potencial sanitário após tratamento das sementes com as moléculas semissintéticas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S Citral, o Phenyl Se Citronelal manifestou um controle positivo sobre o *C. lindemuthianum*, demonstrando uma redução nos danos iniciais nas plântulas de feijão quando tratadas as sementes após inoculação com o patógeno. Sendo possível sugerir que o recobrimento das sementes com esta molécula pode fortalecer mecanismos de defesas nas plântulas contra o processo de infecção de patógenos associados às sementes.

O agente causal da antracnose em feijão é transmitido principalmente pelas sementes. Fator muito importante a considerar, pois, a maioria dos agricultores utiliza as suas próprias 'sementes'. O *C. lindemuthianum* avaliado no estudo tem demonstrado um elevado poder de transmissão, pois, considerando o espaço de tempo que a semente esteve em contato com o fungo, mesmo sem cobrir 100% da área total das sementes, ainda assim, o inóculo demonstrou ser suficiente para causar taxas de transmissão que variaram de 56% a 96%, as lesões que ocorreram por inoculação das sementes mostraram sintomas típicos da doença em todas as partes das plântulas, semente, nos cotilédones, folhas, também sendo encontradas estruturas do patógeno, evidenciando a infecção do patógeno. Pode-se observar na tabela 2, que foram encontrados valores de transmissão muito elevados em sua maioria, independentemente da molécula e concentração, no caso do Phenyl S Citral, nas três concentrações (0,25%, 0,50%,1%) apresentaram altos valores na taxa de transmissão, igualando e/ou superando os valores do controle, quando a molécula Phenyl Se Citronelal apresentaram valores semelhantes com exceção na concentração 1%, apresentando diferença significativa dos demais tratamentos com uma taxa de transmissão de 56%.

Tabela 2 - Taxa de transmissão de *C. lindemuthianum* em plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Níveis de infecção	
Tratamento	IT (%)
Phenyl S Citral (0,25%)	86,00 Aa
Phenyl S Citral (0,50%)	90,00 Aa
Phenyl S Citral (1%)	86,00 Aa
Phenyl Se Citronelal (0,25%)	90,00 Aa
Phenyl Se Citronelal (0,50%)	86,00 Aa
Phenyl Se Citronelal (1%)	56,00 Bb
Não tratada com Molécula	96,00 Aa
Não inoculada e não tratada com molécula	0,00 C

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Pinel (2021).

Resultado semelhantes ao estudo, foram obtidos pelo Vechiato *et al.* (1997) que encontraram altas taxas de transmissão pelo *C. lindemuthianum* em sementes de feijão cultivar Carioca, variando entre 70 a 100% em condições de casa de vegetação, Mesmo em *C. lindemuthianum* altas taxas de transmissão também foram constatadas por Vechato *et al.* (1997), Santos *et al.* (1996), Yesuf e Sanchote (2005) e Rey *et al.* (2009), com percentuais de 60% a 100%, podendo variar devido a fatores como localização do patógeno na semente, condições ambientais, cultivar e nível de inóculo. Por outra parte, pelas taxas de transmissão obtidas no experimento é possível considerar uma (TT) alta, pois, em outras situações como no *Fusarium moniliforme* e *Pyricularia Oryzae*, tem se relatado taxas de 9% a 46% de transmissão de semente para plântula pelos patógenos (SARTORI *et al.*, 2004; MANANDHAR, 1998). Assim, constata-se que o patógeno pode ser transmitido em altas taxas via semente infetada, podendo ser em campo uma fonte de inóculo inicial, o qual poderia causar grandes danos nas culturas, inviabilizando a produção, tornando-se de muita importância aprofundar mais nos estudos com as moléculas testadas.

Em relação às concentrações de clorofila total e carotenoides, a aplicação das moléculas semissintéticas não alterou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) os teores de (CloT). Contudo, os resultados demonstram uma tendência de acúmulo de Clorofilas Totais (CloT), com o aumento da concentração das moléculas. Os teores mais elevados foram encontrados na molécula Phenyl Se Citronelal, em relação à molécula Phenyl S Citral. Sendo observado um acréscimo gradativo no índice de clorofila proporcional ao aumento da concentração (0,25%, 0,50%, 1%) (Figura. 2). Na molécula Phenyl S citral observou-se o menor acúmulo de clorofila na dose menor 0,25% e o maior teor

na concentração 0,50%, quase igualando ao teor de clorofila do Controle 1 no qual as sementes foram inoculadas e não houve aplicação de moléculas.

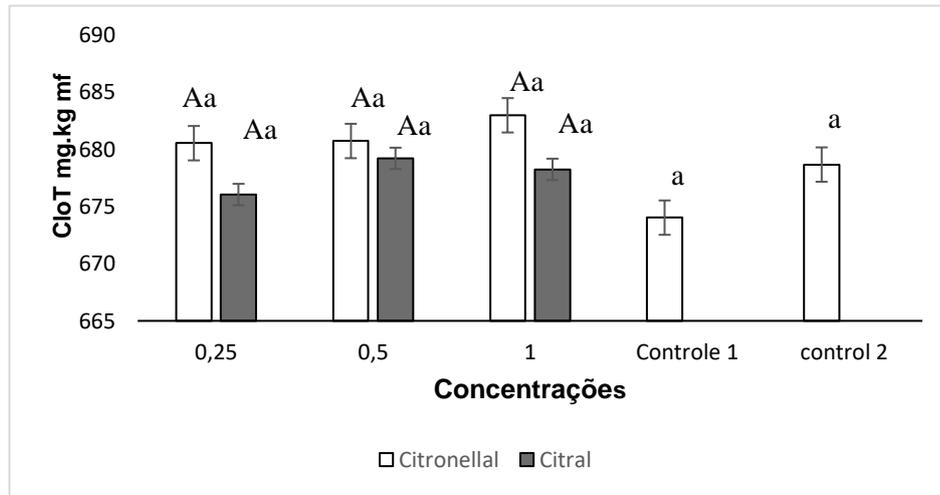


Figura 2 - Concentração de clorofila total (CloT) em folhas de plântulas de feijão, onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). (n=5).

Fonte: Pinel (2021).

Embora não se tenha observado diferenças estatísticas, esses resultados mostram-se promissores, uma vez que nenhuma das moléculas e doses testadas foram menores que o controle, isso leva a crer no efeito das mesmas, as quais podem possivelmente estar ligadas a um aumento de dose. Cabe salientar que as clorofilas além de serem imprescindíveis no metabolismo primário, também possuem importância na indução de metabólitos do mecanismo secundário, já que, para que ocorra ativação dos mecanismos de defesa é necessário o acúmulo de reservas como polissacáridos por parte da planta devido ao gasto energético que ocorre (GAYLER, 2004). Quando as plantas são infectadas por patógenos, a atividade fotossintética e o crescimento pode ser afetado negativamente (DAN GAO *et al.*, 2011; DALLAGNOL *et al.*, 2012).

No estudo I, se observou que as plantas tratadas com a molécula Phenyl Se Citronelal, na maior concentração, apresentaram o menor dano nas plântulas e menor índice de transmissão, sendo os mesmos tratamentos que apresentaram maior acúmulo de teor de clorofila totais. E os tratamentos que observasse teores menores, como no caso dos tratamentos com Phenyl S Citral e controle, o dano pelo fungo na

plântula foi maior, havendo uma redução da concentração de clorofilas totais, podendo-se atribuir a danos causados pelo patógenos, o qual podem causar danos do aparato fotossintético (KUMUDINI *et al.*, 2008), porém, diminuição da atividade fotossintética (BERGER *et al.*, 2004).

Alguns resultados como os obtidos por Bigaton *et al.* (2013), avaliando uso de óleos essenciais de aroeira e quebra-macho em concentrações de 10%, 20% 30%, em soja, relatam não ter encontrado um incremento significativo nos teores de clorofila, mas em outros caso, como do Pereira *et al.* (2013) observaram que o uso de óleos essenciais de chinchilho em batata, fez com que ocorresse um incremento no teor de clorofila, porém, quando utilizadas doses em concentrações mais elevadas. De igual forma, no presente trabalho foi possível observar que a molécula Phenyl Se Citral apresentou um incremento nos teores na maior dose utilizada, sendo também os tratamentos menos afetados pelo patógeno. Por isso, considera-se interessante testar com concentrações mais elevadas das moléculas avaliadas. Com tudo é possível concluir que a aplicação de alguns produtos sintetizado a partir de produtos de origem vegetal com propriedade medicinais, pode induzir a ativação de mecanismos de defesa por parte da planta, ao igual que aumento na síntese de pigmentos fotossintéticos (Martinazzo *et al.*, 2016).

Para os teores de carotenoides (Car) também não houve diferença estatística entre os tratamentos nem controles analisados (Figura 3), não podendo definir uma relação entre a molécula-dose e atividade antioxidante não enzimática. A molécula Phenyl Se Citronelal na concentração ao 0,25% e 1% apresentou resultados semelhantes ao controle. Phenyl S Citral apresentou no teor, uma leve diminuição dos teores de carotenoides na concentração de 0,25%.

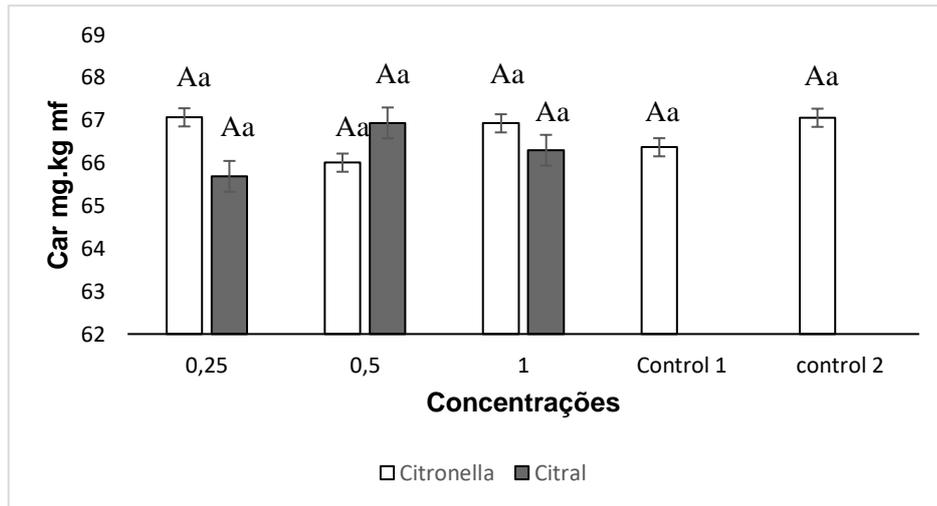


Figura 3 - Concentração de carotenoides (Car) em folhas de plântulas de feijão, onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), barras em cada ponto representam o erro padrão da média. (n=5).

Fonte: Pinel (2021).

Durante o processo evolutivo as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes para a remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo ser enzimáticos e não enzimáticos. Dentro dos não enzimáticos se encontram os carotenoides, pigmentos acessórios, os quais participam da fotossíntese, podem reduzir eventuais danos ao estresse, responsáveis pela remoção de energia, proteção contra danos foto oxidativos, principalmente, pela antioxidação, atuando sobre as formas reativas de  $O^2$  (LAWLOR, 2001). Se sabe que quando as plantas são infectadas por patógenos, a atividade fotossintética e o crescimento podem ser afetados negativamente (DAN GAO et al., 2011; DALLAGNOL et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que danos causados por patógenos pode causar danos do aparato fotossintético, sendo encontrado uma diminuição nos teores de carotenoides (BERGER et al., 2004), como se apresenta no caso dos tratamentos com Phenyl S Citral a exceção da concentração 0.50%, observa-se redução da concentração de Carotenoides, por outro lado relacionado com o estudo I, dentro dos tratamentos com a mesma molécula, aquele que foi tratado com a concentração 0.50% apresentou a maior taxa de transmissão de doença e maior número de plântulas com sintomas observados. Assim, acredita-se na possibilidade de identificar, mediante este tipo de análise, a tolerância e/ou capacidade de desenvolvimento em condições adversas de uma espécie vegetal (SILVA et al., 2014). Como o fato de

atribuir uma redução ocasionada por algum tipo de dano provocado por fitopatógenos. Contudo não encontrando diferencia significativa nos resultados. Bher *et al.* (2010) estudando a interação do patossistema milho - *C. graminicola*, relataram que não ocorreu alteração significativa desses teores, quando avaliadas respostas metabólicas bioquímicas em áreas das folhas afetadas pelo patógeno.

Os maiores valores encontrados dos teores de compostos fenólicos totais foram nos tratamentos com a molécula Phenyl Se Citronelal nas três concentrações, sendo superior aos demais tratamentos, porém, não diferindo estatisticamente. O tratamento 1% apresentou um incremento de 0,95% em relação ao controle 1 (sementes inoculadas com *C. lindemuthianum*, mas não tratadas com as moléculas). A molécula de Phenyl Se Citronelal apresentou uma leve tendência de incremento na concentração de 0,50%. A molécula Phenyl S Citral apresentou os menos valores quando comparados a molécula Phenyl Se Citronelal em todas as concentrações, sendo que a concentração de 0,25% a que apresentou um leve aumento nos teores (Figura. 4).

De forma geral, percebe-se que todos os tratamentos resultaram em valores superiores ao controle 1, podendo-se assumir que a aplicação das moléculas resultou em um leve incremento na atividade dos compostos fenólicos. E sua síntese e concentração nas plantas aumenta quando elas estão sob condições de estresse, já que atuam como agentes protetores contra patógenos, por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

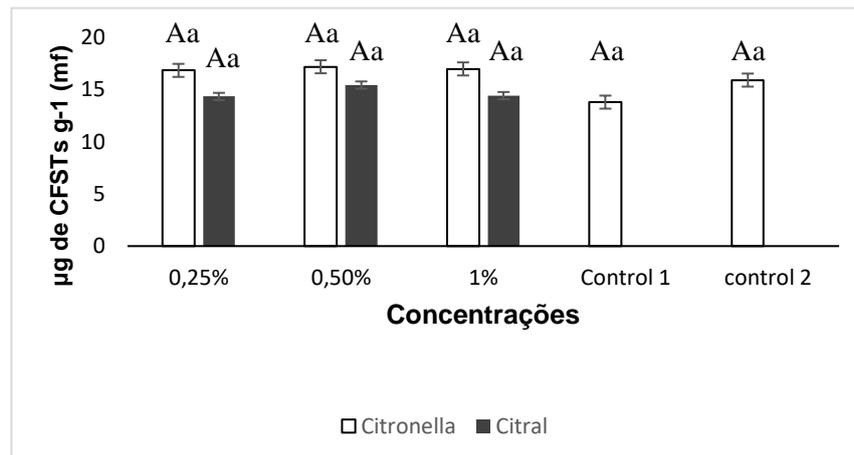


Figura 4 - Concentração de compostos fenólicos solúveis totais (CFSTs) em folhas de plântulas de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronelal) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

Fonte: Pinel (2021).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos também se destaca os compostos fenólicos. Esses metabolitos especializados são constituídos por um grupo fenol, que pode englobar desde moléculas simples a complexas e polimerizadas. Compreende fenóis simples (C6), ligninas (C6-C3), flavonoides (C6-C3-C6), dentre muitos outros, cuja rotas metabólicas são as vias do ácido chiquímico e cinâmico (Fenilpropanoides). A formação dos compostos fenólicos pode ocorrer em condições de estresse, como infecções, sendo conhecidos por ser substâncias com potencial antimicrobiano, que podem estar envolvidos no mecanismo bioquímico estrutural na resistência das plantas (FRIEND, 1981; KULBAT, 2016).

Dessa forma, sabe-se que metabolitos secundários como os fenóis (Grupo hidroxila funcional em um anel aromático), são compostos que fazem parte de um arsenal que está diretamente relacionado com a defesa das plantas, mas o acúmulo destes vai depender do patossistema, nível de suscetibilidade por parte do hospedeiro e do composto utilizado no caso de controle ou indução de resistência (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Assim, o acúmulo de compostos fenólicos nos sítios de infecção, nos estágios iniciais de resposta de defesa por parte da planta, é de suma importância para restringir a possível infecção pelo patógeno. O fato de compostos fenólicos possuírem grande diversidade química faz com eles desempenhem diversas funções nas plantas como o fato de que podem inibir enzimas fúngicas extracelulares,

inibir a fosforilação oxidativa no patógeno e reduzir a disponibilidade de nutrientes para o mesmo (SCALBERT 1991).

Como observado na (Figura 4), o maior acúmulo de compostos fenólicos em plântulas de feijão inoculadas artificialmente com *C. lindemuthianum* foi encontrado nos tratamentos com a molécula Phenyl Se Citronelal, referente aos resultados obtidos no estudo I, é possível acreditar na ativação de mecanismos de defesa por parte da plântula, já que os tratamentos que menor dano observasse pelo fungo acumularam maior concentração de compostos fenólicos, sendo estes ainda superiores que o controle (Plântulas sadias). Trabalhos sobre indução de resistência conduzidos na cultura do sorgo evidenciaram um menor dano à *Peronosclerospora sorghi* devido a uma maior produção de compostos fenólicos (ANWAR *et al.*, 1995). Por outro lado, Kuhn (2007) relata que o uso de algumas moléculas a partir de óleo essencial da flor de chinchilho, com potencial de indução, não alteraram o aumento dos fenóis, o que pode significar que não ocorre uma alteração na rota dos fenilpropanoides. Porém, estudos tem demonstrado que estímulos provocados por agentes externos como os patógenos ou substâncias, podem estimular fluxos de carbono das vias metabólica primária para a secundária, induzindo uma mudança nos recursos disponíveis para síntese de produtos secundários que desempenham papel importante na defesa das plantas (LATTANZIO, 2013).

Quanto a produção da lignina, sementes inoculadas com *C. lindemuthianum* e recobertas com as moléculas em diferentes níveis de concentração, não apresentaram diferença estatística significativa ao ( $p \leq 0,05$ ) em nenhum dos tratamentos, mesmo na comparação com os controles. No entanto, mais uma vez, observa-se que a molécula Phenyl. Se Citronelal apresentou-se superior a Phenyl S Citral, mostrando uma tendência de incremento na produção de lignina. Na figura 5, verifica-se que a concentração 0,50% de Phenyl. Se Citronelal proporcionou o maior incremento até mesmo sobre ambos os controles com diferenças de 0,72% nos teores de lignina.

Trabalhos conduzidos a partir dos tratamentos com óleos essenciais de citronelal e capim-limão, no controle da pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*-Pst) na ativação de respostas bioquímicas de defesa em tomateiro, verificou um aumento relativo do teor de lignina e do teor de compostos fenólicos total (DA SILVA *et al.*, 2017). Por outro lado, Alves *et al* (2006) não encontraram diferença significativa nos teores de lignina em cafeeiro inoculado e não inoculado com

*Cercospora coffeicola*, quando usado produtos à base de extratos vegetais (Tomilho) com potencial de indução. No caso das moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S Citral é possível observar nos resultados (Figura 5) o incremento das concentrações de lignina no tratamento Phenyl Se Citronelal na concentração de 0,50% e 1% encontrando-se acima dos demais tratamentos e controles, no qual pode supor uma ativação de resposta de defesa por parte das plântulas, podendo de igual forma atribuir a função destes mecanismos ao fato de ter encontrado os menores índices de transmissão do fungo e menor porcentagem na escala de incidência nas plântulas, nos mesmos tratamentos, como se sabe, precursores de lignina podem exercer efeito tóxico sobre os patógenos ou conduzir a lignificação também de estruturas do mesmo, dificultando assim, a progressão do agente agressor (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

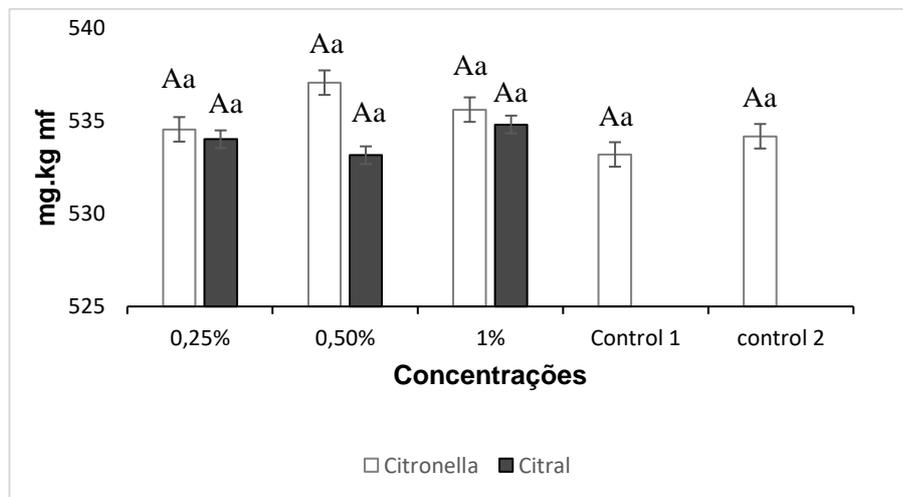


Figura 5 - Concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (DLATG) em folhas primárias de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%), Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. ( $n=5$ )

Fonte: Pinel (2021).

A lignina sendo uma macromolécula fenólica complexa, é o segundo composto mais abundante nos tecidos vegetais. Pode atuar como uma barreira física com resistência à penetração e ao desenvolvimento contra o ataque dos patógenos, aumentando a resistência da parede celular. Essa resistência mecânica à parede celular afeta a difusão de enzimas líticas e toxinas não específicas ao hospedeiro, que são produzidas durante a colonização do tecido (FORTUNATO *et al.*, 2012). Maior parte das substâncias que pertencem ao grupo de compostos fenólicos são derivados

da rota do ácido chiquímico onde a fenilalanina representa ponto importante para a produção dos mesmos, no qual é intensificada quando existe uma influência por fatores como a presença de fitopatógenos nos órgãos das plantas, e ativada mediante o uso de produtos com o potencial para aumentar a atividade das enzimas no metabolismo dos fenóis (LATTANZIO *et al.*, 2001, FUCHIGAMI, 2018).

Na avaliação da atividade da SOD, percebeu-se a inexistência de diferenças significativas dentro das concentrações das moléculas avaliadas, mesmo em relação às plantas controles. Mas percebe-se na (Figura 6), que a concentração de SOD nos tratamentos com Phenyl Se Citronelal são maiores que nos tratamentos com Phenyl S Citral. O mesmo ocorre em relação aos controles, havendo um acréscimo gradual com o aumento da concentração de até 9% em comparação ao menor valor encontrado nas análises, porém, não foi encontrada diferença estatística. Da mesma forma, a molécula Phenyl S Citral apresentou valores maiores que os controle, com exceção da concentração 0,25%. O tratamento com maior atividade foi pela molécula Citronelal ao 1%. Resultados obtidos por EHSANI-MOGHADDAM *et al.*, (2006), em folhas de cultivares de morangos resistentes e suscetíveis a *Mycosphaerella fragariae* relatou resultados não significativos na atividade da SOD, mas havendo um leve aumento da atividade no cultivar resistente.

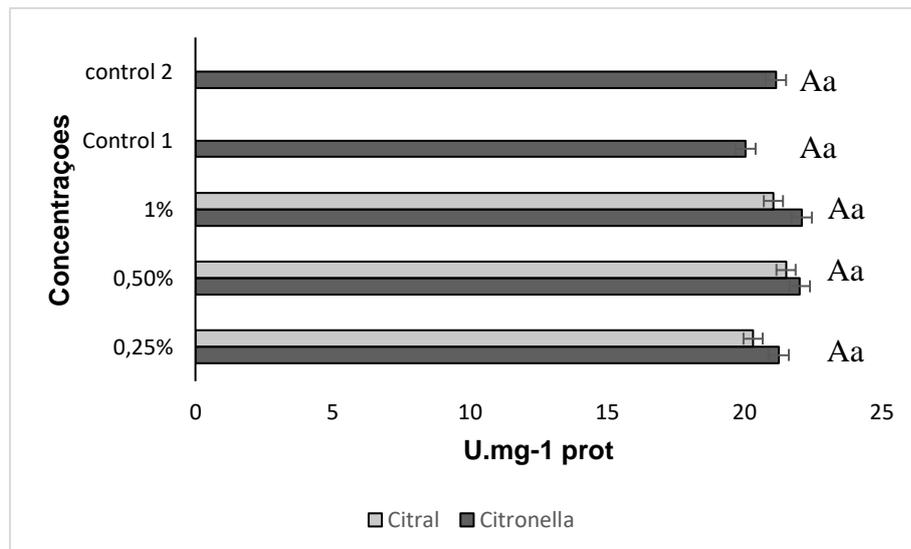


Figura 6 - Atividade específica da enzima Superóxido dismutase (SOD), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. (n=5)

Fonte: Pinel (2021).

Os mecanismos de defesa das plantas levam à produção de ERO's, especialmente  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (BIEHLER; FOCK, 1996, LUBAINA AS, 2013). Assim, aumentos na capacidade do sistema antioxidante são necessários para eliminar ERO's. Porém, uma das enzimas que constitui a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de  $O_2^-$  é a SOD, pois catalisam a dismutação desse radical a peróxido de hidrogênio, sua atividade se associa com o aumento a tolerância ao estresse, sinalização, lignificação, ou recuperação da parede celular rompida (EHSANI-MOGHADDAM *et al.*, 2006; GRATAO *et al.*, 2005).

Além do maior acúmulo da atividade Super Oxido Dismutase por parte da molécula Phenyl Se Citronelal nas concentrações 0,5% e 1%, e possível associar a menor severidade da doença e taxa de transmissão (Figura 1) (Tabela 2) Devido a que o leve aumento da atividade da SOD nestes tratamentos poderia sugerir um aumento de  $O_2^-$  nas plantas numa tentativa de superação dos danos causados na fase inicial, pelo patógeno, como uma fase regenerativa em resposta ao estresse ou ao estímulo das moléculas. Moreira *et al.* (2008) tem comprovado o efeito elicitor de compostos a base de citronela e citral, em sorgo e soja sobre *Colletotrichum lagenarium*. Assim, seria possível atribuir uma possível ativação de enzimas antioxidantes por parte de planta como mecanismo de defesa quando tratadas com as moléculas.

Moléculas não convencionais como os extratos de plantas medicinais e óleos essenciais podem apresentar a capacidade de proteger contra infecções por patógeno mediante uma indução de resistência que envolve a ativação de mecanismos bioquímicos em resposta a estes eliciadores (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). É importante mencionar, devido a que não tem sido possível obter diferenças estatísticas, normalmente, as concentrações a serem utilizadas para novas moléculas são preestabelecidas de acordo a literatura ou testes *in vitro*, porém, diversas concentrações podem ser encontradas na literatura e os testes *in vitro* nem sempre são representativos devido ao fato do patógeno se comportar de forma diferente quando interage com a planta (DA SILVA *et al.*, 2017).

Quanto a atividade Catalase (CAT), no presente estudo, foram observadas tendência de maior atividade nos tratamentos de Phenyl Se Citronelal, o aumento na dose desta molécula proporcionou um acréscimo gradativo da atividade catalase, sendo superada apenas pela concentração 0,50% da molécula Phenyl S Citral (Figura

7). Por outro lado, na molécula Phenyl S citral nas concentrações de 0,25 e 1% houve uma redução da atividade, encontrando valores abaixo de ambos os controles.

Resultados obtidos por Valente (2012), na utilização de produtos com potencial de indução a resistência obtido de extratos vegetais em mudas de cafeeiro, avaliando a atividade Catalase, obteve um leve aumento desta, podendo se tratar de uma proteção contra o ataque a determinado patógeno. De Siqueira (2008), relatou resultados similares quando avaliou a utilização de acibenzolar-Smetil (ASM) em diferentes concentrações como indutor de resistência contra *C. lindemuthianum* em feijão caupi. Em estudos de indução de resistência no controle de *Pseudomona* sp, no feijão, mediante o uso de óleos essenciais, encontrou-se um leve aumento quanto a produção de enzimas antioxidantes (VIGO SCHULTZ, 2008). Porém tratando-se de distintos patossistemas, é possível atribuir a substâncias com bases naturais a capacidade de induzir mecanismos de defesa nas plantas, como foi observado no presente estudo, porém não havendo diferença estatística, mas encontra-se um leve acúmulo na atividade da Catalase (CAT), em algum dos tratamentos como no caso do Phenyl S Citral na concentração de 0,50% e Phenyl Se Citronelal ao 0,50% e 1%. Cabe ressaltar que os tratamentos com maiores doses resultaram em maior atividade bioquímica na planta, os quais da mesma forma foram observado menor presença de sintomas nas plântulas, o que conseqüentemente se pode atribuir numa resposta de defesa induzida pela aplicação destas substâncias.

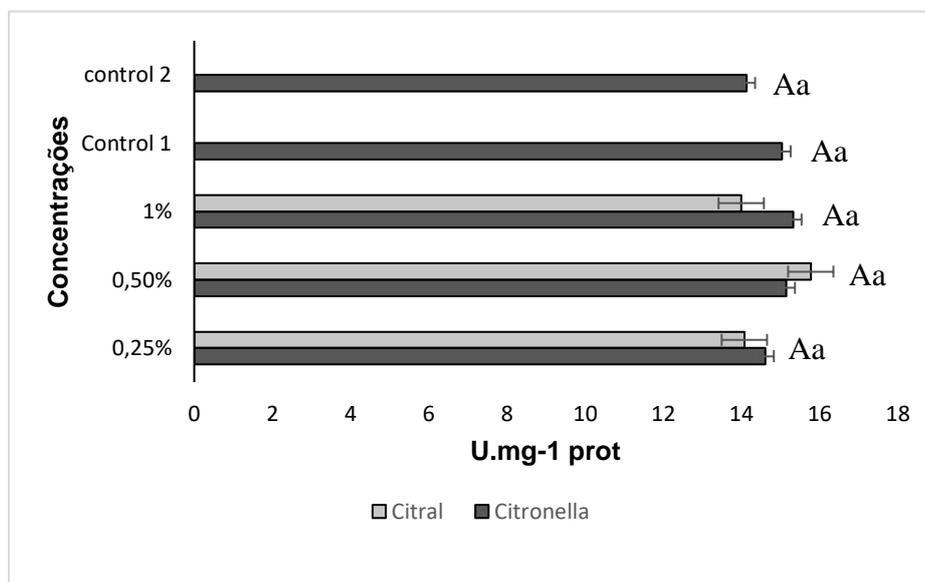


Figura 7 - Atividade específica da enzima Catalase (CAT), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Semente sadia). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. (n=5).

Fonte: Pinel (2021).

A enzimas antioxidantes que apresentam ferramentas eficientes no controle ou remoção do excesso de  $H_2O_2$  produzidas pela atividade SOD, a CAT desempenha um papel muito importante (FEIERABEND, 2005). A enzima CAT elimina  $H_2O_2$  através de uma reação no qual o  $H_2O_2$  é transformado em  $O^2$  e  $H_2O$ . Mesmo assim, a CAT cumpre um papel específico, protegendo as células dos efeitos tóxicos do excesso de concentrações de  $H_2O_2$ , embora seja uma substância fundamental para a defesa das plantas, funcionando tanto como um agente diretamente tóxico ao patógeno como molécula sinalizadora para a expressão de genes de resistência, podendo ser letal também para as próprias células vegetais (GILL, 2010; PATEL *et al.*, 2011).

Com relação à atividade de APX (Figura 8), pode-se observar que não foram encontradas diferenças significativas entre as plântulas tratadas com a molécula Phenyl S Citral e Phenil Se Citronelal, mesmo em relação aos controles. A molécula Phenyl S citral acarretou uma maior atividade enzimática na concentração ao 1% sendo superior que no Phenyl S Citronelal, 1,62%. A menor atividade foi nas concentrações 0,50% de ambos compostos.

Como demonstrado, existe um acúmulo na atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) em todos os tratamentos por acima dos controles, e que, a maior concentração maior atividade da enzima, o qual é também possível relacionar com a maior tolerância por parte da planta ao *C. lindemuthianum* fato que é descrito no estudo I. Estes resultados podem sugerir que possivelmente houve um leve incremento do  $H_2O_2$ , aparentemente, o que seria suficiente para acionar respostas de defesa dependentes de  $H_2O_2$ . Sendo a APX, das primeiras enzimas a ser ativada, pois é responsável pela remoção de  $H_2O_2$

Resultados similares, onde a atividade CAT e APX aumentam sem diferença estatística, já foram relatados em estudos realizados com diferentes genótipos de aveia quando inoculados com *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* (FIGUEIRÓ *et al.*, 2013). Mesmo resultados encontrados por De Siqueira (2008), que relata que pode não existir diferença significativa na atividade de APX dias depois da inoculação com *C. lindemuthianum* em feijão caupi. Becker (2005), utilizando extrato bruto de alecrim

e cúrcuma, mas, relata que houve uma proteção contra doenças de final de ciclo na soja, porém, esta proteção não apresentou atividade enzimática com diferença significativa. Por outro lado, Formentini (2012), utilizando o mesmo extrato na cultura de tomateiro, encontrou aumento significativo na atividade enzimática antioxidante.

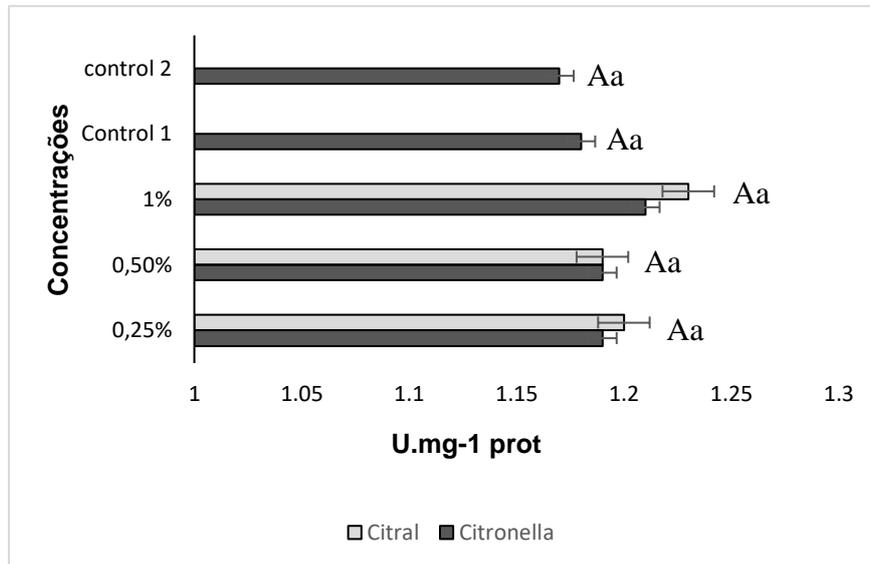


Figura 8 - Atividade específica da enzima Ascorbato peroxidase (APX), em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes sadias). Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey. Barras em cada ponto representam o erro padrão da média ( $p < 0.05$ ). ( $n=5$ ).

Fonte: Pinel (2021).

Os tecidos vegetais possuem enzimas antioxidantes para neutralizar os danos causados por espécies reativas de oxigênio. Dentre estas, o APX, predominantemente citosólica e organelar, drenando o  $H_2O_2$  produzido por SOD. Como mencionado anteriormente, o  $H_2O_2$  funciona acionando mecanismos complexos de defesa das plantas contra patógenos, além disso, sua resposta pode aumentar em relação aos tratamentos indutores e a suscetibilidade à resistência a estresses bióticos da planta, que está diretamente relacionada com a eficiência das enzimas oxido-redutases como no caso da APX, SOD, CAT, já que agem diretamente sobre o patógeno ou regulam a propagação dos processos oxidativos (ANTEROLA 2002).

A extensão do dano oxidativo pela geração de ROS devido a inoculação em sementes com o patógeno foi verificada como teor de malonaldeído (MDA). As concentrações de MDA foram medidas para determinar a extensão do dano celular nas membranas das células do feijão por infecção fúngica. Nas análises de MDA feitas

neste estudo, não foi encontrada diferença estatística entre as duas moléculas em interação com as doses, nem mesmo em comparação aos controles. A taxa de peroxidação lipídica nas folhas primárias do feijão oriundo de sementes inoculadas, os teores de malonaldeído (MDA) (Figura 9) nas concentrações 0,25% e 0,50% de Phenyl S citral apresentaram um incremento no teor de MDA, valores maiores comparado aos controles, 6% em relação ao controle 1 e 15,90% ao controle 2. Caso contrário foi encontrado na concentração de 1% em ambas moléculas; apresentando os menores teores de MDA, observando valores iguais no (Citral) e menores 0,44% (Citronela) que no controle 2 (plantas saudas), mesmo estas sendo menor que em comparação ao controle 1.

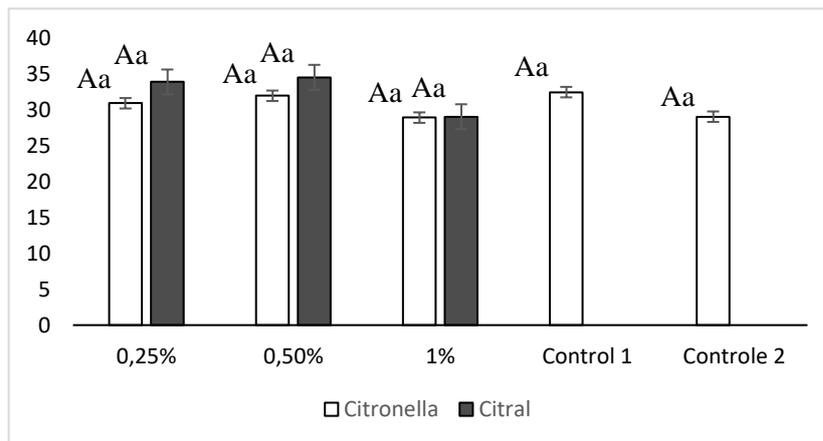


Figura 9 - Peroxidação lipídica pela quantificação do teor de malonaldeído (MDA) em folhas de plântula de feijão onde as sementes foram inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* e recobertas com as moléculas Phenyl S Citral (Citral) e Phenyl Se Citronelal (Citronella) nas concentrações (0,25%, 0,5%, 1%) Controle 1 (Sementes sem molécula e inoculadas), Controle 2 (Sementes saudas). Barras em cada ponto representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas e minúsculas iguais sobre as colunas indicam que as médias dos tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ( $n=5$ ).

Fonte: Pinel (2021).

Quando as espécies ativas de oxigênio ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ou  $-OH$ ) reagem com lipídeos ocorre a peroxidação destes e conseqüentemente a formação, dentre outros compostos, de MDA. A concentração deste produto é utilizada como indicador para o dano às membranas celulares induzido por qualquer tipo de estresse (JALLOUL et al., 2002). Como visto na figura 9, a menor concentração de MDA ocorreu com a aplicação de ambas moléculas, porém nas maiores concentrações, no qual as mesmas apresentaram maior atividade enzimática, assim, é possível atribuir que aqueles tratamentos que apresentaram maior acúmulo de substâncias químicas ligadas a defesa da planta resulto em menor peroxidação lipídica, contudo, as sementes que foram tratadas com as moléculas nas maiores concentrações, danos por causa do

patógeno foi menor. Trabalhos tem relatado a capacidade do óleo essencial à base de extrato vegetal citronela em controlar fungos fitopatogênicos e também sua ação como elicitador. Com a adição de selênio na sua composição tornou-se possível conceder a capacidade de modular positivamente a atividade das enzimas antioxidantes: dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e catalase, envolvidas no mecanismo de tolerância das plantas aos danos oxidativos induzido por estresse biótico (FENG *et al.*, 2013; HASANUZZAMAN; FUJITA 2011). Além disso, se tem comprovado os efeitos do Selênio (Se) na homeostase celular, redução do estresse oxidativo, incremento da taxa fotossintética, mesmo sobre condições ideais (GUERRERO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2011).

Da mesma forma, os compostos Phenyl S Citral proveniente do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) constituído pelos majoritários monoterpenos citral, apresentaram-se promissores no controle de fitopatógenos, assim com a adição do elemento (S) que também se conhece por apresentar capacidade no controle de doenças, importância na biossíntese da clorofila, dentre outros atributos, podendo ser um produto promissor, porém, possivelmente para este patossistemas foco deste trabalho, deve-se fazer ajustes das doses das moléculas, como feito por Alves *et al.* (2003), que demonstrou a eficiência de monoterpenos de citronelal e citral, igual ao dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) e *C. nardus* (Citronela) no controle de *Colletotrichum musa*.

Assim, resultados deste estudo podem suportar o conceito de uma possível absorção das moléculas semissintéticas Phenyl S Citral e Phenyl Se Citronelal, através do tratamento de sementes, podendo induzir a expressão dos mecanismos de defesa.

Os fungos patogênicos possuem diversos fatores de virulência para causar doenças, os quais permitem que o fungo adira, penetre e interfira nas funções celulares de seu hospedeiro. Dentre seus inúmeros e variados fatores de virulência, destaca-se o papel das enzimas, que permitem ao fungo degradar constituintes importantes das barreiras externas de proteção dos hospedeiros, pelas quais pode penetrar e colonizar os tecidos (ORTONEDA *et al.*, 2004).

Os fungos para a obtenção dos nutrientes requeridos para seu desenvolvimento precisam da síntese e secreção de enzimas para tornar substratos insolúveis em metabolitos solúveis, e assim serem absorvidos enzimaticamente. Isolados fúngicos também podem ser diferenciados por meio da produção enzimática,

pois alguns fungos produzem determinadas enzimas em quantidades distintas e essas ainda podem ser inibidas pela ação de algum agente externo.

No estudo III, o fungo *C. lindemuthianum*, raça 86, apresentou atividade enzimática amilolítica, evidenciada pela presença do halo claro em torno da colônia, sendo este, relativamente baixo, apenas observável nos diferentes tratamentos, porém, apresentando diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Sendo percebido maior atividade nos tratamentos com A2 Phenyl S Citral nas concentrações 0,125% e 0,25%, com índices enzimáticos de 0,86 e 0,88 e no controle com DMSO com H/C de 0,91, logo, a menor atividade foi observada nos tratamentos A3-Phenyl Se Citronelal, na concentração 0,125% com um índice enzimático de 0,67 apresentando diferença significativa aos demais tratamentos, com exceção da concentração 0,625% pela mesma molécula A3 onde o H/C foi de 0,72, conforme apresentado na (tabela 2). Dessa forma, é possível observar que a molécula Phenyl Se Citronelal pode levar a uma redução na atividade amilolítica do patógeno. Cabe ressaltar que os índices enzimáticos para todos os tratamentos foram inferiores a 2,0, o que é considerado como baixo.

Tabela 3 - Atividade enzimática Amilase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos A2 (Phenyl S Citral), A3 (Phenyl Se Citronelal).

<b>Tratamento</b>	<b>Índice enzimático (H/C)</b>
Phenyl S Citral 0,0625	0,79 BC
Phenyl S Citral 0,125	0,88 CD
Phenyl S Citral 0,25	0,86 CD
Phenyl Se Citronelal 0,0625	0,72 AB
Phenyl Se Citronelal 0,125	0,67 A
Phenyl Se Citronelal 0,25	0,87 CD
Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,91 D
Testemunha	0,85 CD

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.

Fonte: Pinel (2021).

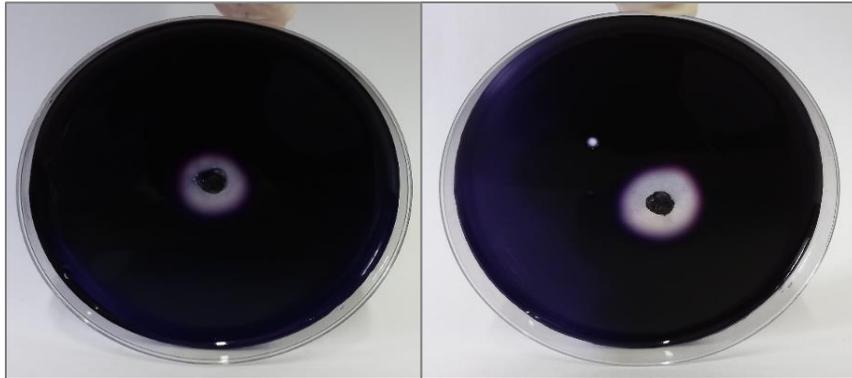


Figura 10 - Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares amilolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de cor claro.  
Fonte: Pinel (2021).

As amilases são enzimas com capacidade de degradar moléculas de amido, principal fonte de reserva nas células vegetais, degradando este polissacarídeo em molécula de glicose, que são utilizadas no metabolismo vegetal (PASCHOLATI, 2011).

Conforme os dados mostrados (Tabela 3), percebe-se que todos os tratamentos apresentaram baixa atividade amilolítica com halos de degradação entre os 0,12 mm 0,18 mm. Na Figura. 11, é possível visualizar essa degradação semitranslúcida no entorno da colônia, indicando que o substrato composto por carboximentilcelulase (CMC) foi degradado. Assim, os resultados chamam a atenção ao fato de que o patógeno faz uso do amido como fonte de energia para seu desenvolvimento, e que submetido a determinadas concentrações dos compostos semissintéticos, o patógeno pode apresentar menor atividade amilolítica. Porém, é possível que a uma maior concentração do produto iniba a produção em maior grau desta enzima.

São poucos os estudos onde foi testada a atividade enzimática *in vitro* em fungos fitopatógenos quando adicionados a produtos com capacidade antimicrobiana. No entanto, resultados com relação ao índice na atividade amilolítica obtidos por BEZERRA, (2017) tem relatado variação por parte de isolados fitopatogênicos de *Colletotrichum* spp. alguns não apresentando, e outros com baixa atividade deste em meio solido específico. Resultados semelhantes também foram obtidos por Assis *et al.* (2010), onde demonstraram uma baixa produção de amilase em *Colletotrichum gleosporoides*. Assim como, os estudos feitos pelo Tozze Júnior (2012), avaliando isolados de *Colletotrichum* spp. em maracujazeiro, pessegueiro mangueira e

abacateiro, não detectaram a presença de atividade amilolítica. No entanto, tem sido descrita a capacidade da produção de enzimas amilase secretadas por isolado do gênero *Colletotrichum* spp., no qual identificam que mediante estas são capazes de destruir componentes estruturais de tecidos da planta, e em alguns casos, culminar com a morte celular. Cabe mencionar que a enzima amilases, tem sido descrita na literatura para gêneros fúngicos que atacam os órgãos de armazenamento de amido nas plantas, destacando-se patógenos que infectam sementes de espécies de importância agrícola como é no caso do *C. lindemuthianum* (MARCHI et al., 2009).

Os compostos semissintéticos Phenyl Se Citronelal e Phenyl S Citral aplicados ao meio mínimo não promoveram nenhum efeito na produção da atividade celulase por parte do patógeno, já que a maioria dos valores foram iguais nos diferentes tratamentos e concentrações, mesmo na testemunha e controle (Tabela 4). Com relação a produção de celulase, Lima (2003) e Da Silva (2016) detectaram baixa atividade celulolítica em diferentes isolados de *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum* spp.

Tabela 4 - Atividade enzimática Celulase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.

<b>Tratamento</b>	<b>Índice enzimático (H/C)</b>
Phenyl S Citral 0,0625	0,14 Aa
Phenyl S Citral 0,125	0,13 Aa
Phenyl S Citral 0,25	0,12 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,0625	0,13 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,125	0,13 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,25	0,18 Aa
Dimetilsulfóxido (DMSO)	0,12 Aa
Testemunha	0,13 Aa

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferencia estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.

Fonte: Pinel (2021).



Figura 11 - Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares celulolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de cor laranja claro.  
Fonte: Pinel (2021).

Conforme mostrado (Figura. 11), os tratamentos apresentaram halos de degradação no substrato. No entanto, considerando-se a atividade celulolítica baixa (Tabela. 4) sem nenhum efeito aparente por parte das moléculas. Dentro os fitopatógenos, o papel das celulasas já foi comprovado em diversos patossistemas vegetais, e estudos indicam que a secreção dessas enzimas pode ser determinante para a ocorrência de alguns sintomas nas plantas (BENHAMOU, 1991) já que a produção da enzima celulose permite o estabelecimento do patógeno na superfície da planta, no qual produz amolecimento, devido à desintegração dos componentes da parede celular, e permite a penetração e propagação do patógeno nos tecidos de sua hospedeiro, o que leva ao colapso e desintegração de sua estrutura celular. Sabe-se que a produção da enzima celulase favorece aos fitopatógenos na degradação da celulase e fosfolipídios da parede celular e membrana plasmática do hospedeiro, por exemplo. É importante também mencionar a ação dessas enzimas na desintoxicação de compostos antifúngicos e tanino que podem estar presentes no hospedeiro.

A atividade lipolítica também foi produzida pelo patógeno nos diferentes tratamentos avaliados, o halo de degradação característico pelo acúmulo de sais em torno da colônia do fungo foi claramente observado. No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos nem em comparação com a testemunha e controle (DMSO). Mas os índices de atividade enzimática foram considerados altos, entre 1,65 mm e 2,05 mm. O maior halo produzido foi observado na concentração 0,25% da molécula Phenyl Se Citronela "A3", seguido pelo controle (DMSO) com 2,03 mm, o menor foi na concentração 0,125% pela molécula Phenyl S Citral de 1,69 mm (Tabela. 5). Embora sem diferença estatística, os resultados obtidos neste estudo, apontam o

composto Phenyl S Citral, nas concentrações 0,125% e 0,25%, como um candidato a reduzir a atividade lipolítica.

Estudo feito por Maria *et al.* (2005), em que avaliaram a produção de enzima lipolítica em fungos como: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp utilizando meio solido especifico, a produção de lipase foi observada em todos os fungos testados. A produção de enzimas para espécies do gênero *Colletotrichum* tem sido pouco descrita na literatura, mas de igual forma resultados têm sido obtidos por alguns autores, Luz *et al.* (2006) avaliando a produção de lipase em diversos gêneros de fungo (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Nigrospora* e *Phomopsis*) caracterizando-se como produtores de lipase. Com tudo, não foram encontrados estudos que tem avaliado a produção lipolítica de fungos fitopatógenos *in vitro* quando tratado o meio com produtos de ação antimicrobiana.

Tabela 5- Atividade enzimática lipases de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.

Tratamento	Índice enzimático (H/C)
Phenyl S Citral 0,0625	1,98 Aa
Phenyl S Citral 0,125	1,69 Aa
Phenyl S Citral 0,25	1,74 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,0625	1,79 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,125	1,97 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,25	2,07 Aa
Dimetilsulfóxido (DMSO)	2,03 Aa
Testemunha	1,86 Aa

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.

Fonte: Pinel (2021).

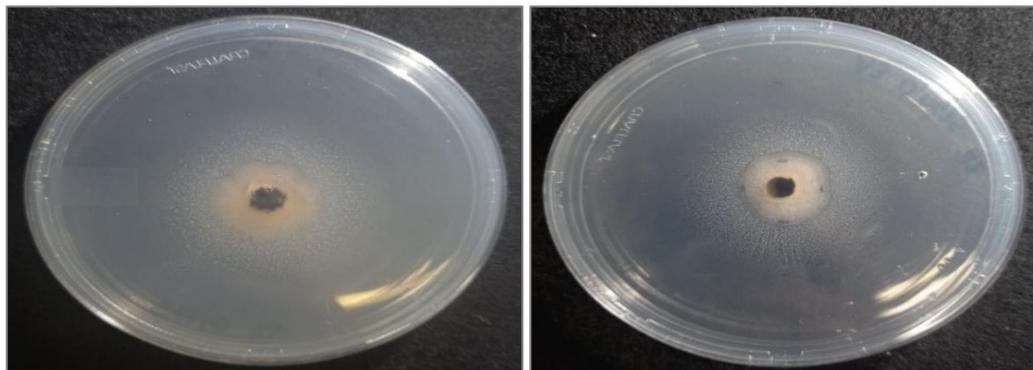


Figura 12 - Acúmulo de sais em torno da colônia produzido por enzimas extracelulares lipase, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral.

Fonte: Pinel (2021).

Nos últimos anos, tem havido muitas evidências de que diferentes espécies de *Colletotrichum* podem usar enzimas lipolíticas como fatores de patogenicidade. As lipases pertencem ao grupo das enzimas produzidas por microrganismos fitopatogênicos que atuam na membrana plasmática e no protoplasto das células vegetais, nas quais podem ser encontrados diferentes tipos de lipídios que serão degradados por meio das enzimas lipolíticas e que podem ser secretados pelos fungos (PASCHOLATI, 2011). A ação das lipases é definida como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, sua função biológica é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres e glicerol (MARTINS *et al.*, 2008).

Nos testes feitos com substrato para a produção de potreaase, a atividade proteolítica também foi detectada em todos os tratamentos, no qual foi caracterizada por um halo de degradação transparente, observou-se os maiores índices enzimáticos, 1,50 mm a 1,70 mm, porém, não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 5). O menor índice foi obtido na concentração de 0,25%, independente do composto utilizado. Poderia se dizer que a maior concentração do produto existe uma tendência a diminuir o índice enzimático. Havendo um melhor resultado na molécula Phenyl S citral.

Tabela 6 - Atividade enzimática protease de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.

<b>Tratamento</b>	<b>Índice enzimático (H/C)</b>
Phenyl S Citral 0,0625	1,77 Aa
Phenyl S Citral 0,125	1,70 Aa
Phenyl S Citral 0,25	1,52 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,0625	1,75 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,125	1,73 Aa
Phenyl Se Citronelal 0,25	1,67 Aa
Dimetilsulfóxido (DMSO)	1,75 Aa
Testemunha	1,77 Aa

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao 5% de probabilidade.

Fonte: Pinel (2021).

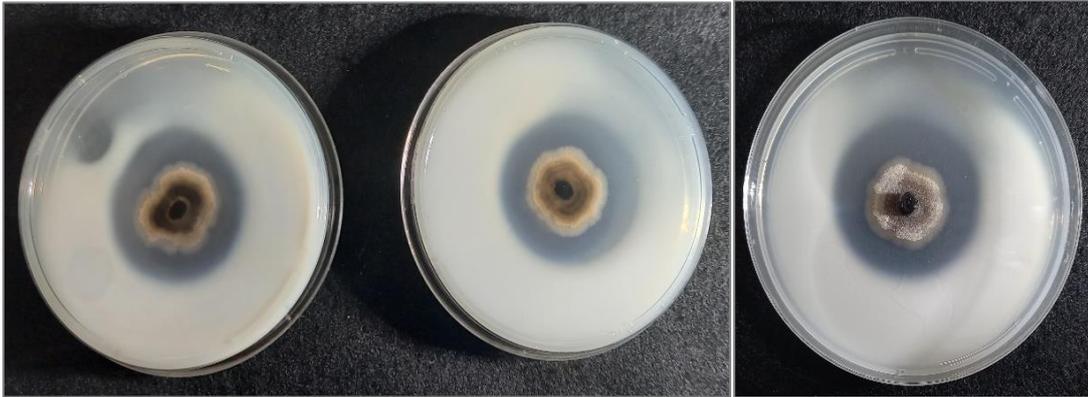


Figura 13 -. Halo de degradação produzido por enzimas extracelulares proteolítica, excretadas pelo *Colletotrichum lindemuthianum*, sendo o meio tratado com as moléculas Phenyl Se Citronelal e Phenyl S citral. Halo de degradação apresenta-se na borda da colônia de aparência transparente.  
Fonte: Pinel (2021).

As proteases são enzimas que influenciam no metabolismo de todos os organismos, clivam ligações peptídicas nas proteínas, que podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção pelo microrganismo (TREMACOLDI, 2009) cujo objetivo será degradar proteínas que serviram como fonte de carbono e nitrogênio nos processos celulares (VERMELHO, 2008). Segundo o Redman e Rodriguez (2002), sugerem que atividade protease extracelular pode ser considerada essencial no processo de patogenicidade de fungos do gênero *Colletotrichum*. Porém, no presente trabalho foi das enzimas que maior atividade apresento. Para os propósitos deste estudo, esses resultados são de grande relevância, pois podem indicar a capacidade do isolados em causar doenças.

Tabela 7 - Atividade enzimática pectinase de *Colletotrichum lindemuthianum* por difusão em substratos sólidos específicos.

Tratamento	Crescimento da colônia
Phenyl S Citral 0,0625	18,22
Phenyl S Citral 0,125	19,23
Phenyl S Citral 0,25	18,9
Phenyl Se Citronelal 0,0625	17,09
Phenyl Se Citronelal 0,125	17,81
Phenyl Se Citronelal 0,25	15,92
Dimetilsulfóxido (DMSO)	19,80
Testemunha	18,92

Fonte: Pinel (2021).

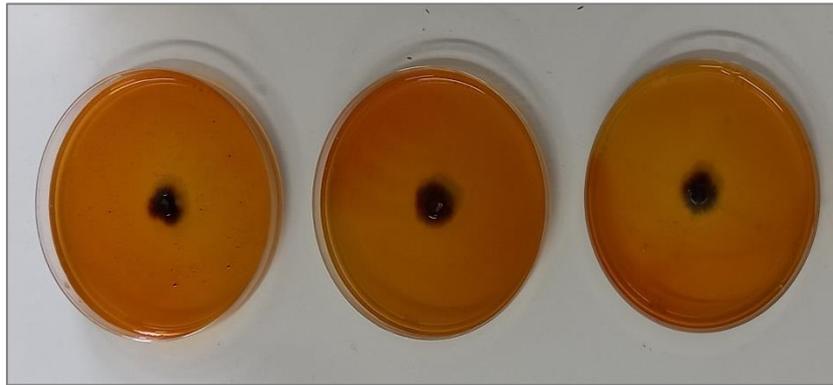


Figura 14 – Não presença de halos de degradação para atividade pectinolítica.  
Fonte: Pinel (2021).

No teste enzimático pectinase, não houve formação de halo de degradação em nenhum dos tratamentos nem controles, entretanto, sim houve crescimento da colônia, apresentando valores (cm) semelhantes da colônia do fungo em todos nos tratamentos no meio sólido específico, sendo apenas menores nos tratamentos com a molécula Phenyl Se Citronelal “A3”. Foram testados dois tipos de substratos, porém em nenhum apresentou halo de degradação, o que permitiria pensar em que a cepa 86 do fungo *C. Lindemuthianum* não produz enzima pectinase. Geralmente se sabe que as enzimas pectinolíticas são as primeiras enzimas produzidas por fungos fitopatogênicos para quebrar e atacar os polímeros da parede da planta e da lamela média.

Durante a infecção e colonização, as pectinases compõem um grupo muito diversificado de enzimas que realizam a quebra de substâncias pecticas através de processos de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (SILVA, 2003; SILVA *et al.*, 2009). As enzimas pectinolíticas produzidas pelos fitopatógenos têm a capacidade de consumir os tecidos do hospedeiro e matar suas células (ANNIS; GOODWIN, 2004), degradando a pectina, principal componente das paredes primária e a lamela média, assim, facilitando o processo de colonização por parte do patógeno (CRUZ, 2014).

A atividade patogênica dos fungos está diretamente relacionada com a capacidade de produzir enzimas extracelulares. Resultados deste trabalho demonstram que *C. lindemuthianum* raça 86, causador de antracnose em feijão tem a capacidade de produzirem enzimas extracelulares inclusive tratados os meios específicos utilizados, adicionando moléculas com potencial antimicrobiano, porém as

doses utilizadas foram concentrações que em trabalho prévio, Zabotti (2019), inibiram 50% do crescimento do fungo, para permitir o desenvolvimento do mesmo, em questão de análises da atividade enzimática ligada a patogênese. Contudo, conforme os resultados, as enzimas avaliadas e que foram produzidas pelo *C. lindemuthianum* podem desempenhar funções fundamentais em sua interação patogênica já que podem estar diretamente envolvidas na infecção e colonização do hospedeiro. A produção destas diferentes classes de enzimas pode permitir que o patógeno se adapte eficientemente a diferentes ambientes. Mesmo o que permite sugerir a capacidade por parte do isolado, de degradar barreiras de proteção e compostos intracelulares do hospedeiro.

## 5 Conclusões

O tratamento das sementes com a molécula Phenyl Se Citronella apresentou resultados positivos quanto ao controle de *C. lindemuthianum*.

Quanto às respostas bioquímicas nas plântulas oriundas de sementes inoculadas e tratadas com os compostos semissintéticos, embora não tenha ocorrido diferença entre os tratamentos, foi possível observar que as moléculas, em especial Phenyl Se Citronelal, que se apresentou como promissora na indução de resistência de feijão à *C. lindemunthianum*.

As moléculas Phenyl Se Citral e Phenyl Se Citronelal não apresentaram um efeito significativo na produção de enzimas ligadas a patogenicidade no fungo *C. lindemuthianum*., porém, as doses mais elevadas apresentaram-se promissoras.

## Referências

- ABREU.; NERY, A. N. I. **Efeito de óleos essenciais sobre o desenvolvimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* e na síntese de ocratoxina A.** 2015. 91 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2015.
- AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology.** Boca Raton: CRC Press, 1987. V. 1. 175 p.
- AGUIAR, C. E.; BERTUZZI, E. C.; DEUNER, C.; MENEGHELLO, G. E.; CAMPOS, E. J.; KERCHNER, A. C. Performance fisiológica de sementes de milho híbrido submetidas a tratamento com inseticida, fungicida e nutrientes. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 2, p. 348-355, 2018.
- ALVES, M. C.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ARAÚJO, D. V.; TALAMINI, V.; ANTUNES, M. D. C.; CAVACOB, A. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 351-366, 2010.
- ASSIS, T.C., MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO R.S.B. 2010. Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using total proteins and esterase electrophoretic patterns and extracellular enzyme production. **Summa Phytopathol**, v. 27, p. 208-212.
- BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, p. 1184–1191, 1997.
- BARBOSA, F.R.; GONZAGA, O. A. C. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira:** 2012-2014. Santos de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p.
- BAYOUMI, Y.; TAHA, N.; SHALABYA, T.; ALSHAALD, T.; EI-RAMADYD, H. Sulfur promotes biocontrol of purple blotch disease via *Trichoderma* spp. and enhances the growth, yield and quality of onion. **Applied Soil Ecology**, p. 10, 2018.
- BEHR M.; HUMBECK K.; HAUSE G.; DEISING B. D.; WIRSEL S. G. R.; The hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, p. 879-892, 2010.
- BERGER S.; PAPADOPOULOS M.; SCHREIBER U.; KAISER W.; ROITSCH T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. **Plant Physiology**, v. 122, p. 419-428, 2004.
- BEZERRA, C. de S. **Caracterização enzimática de *Colletotrichum* spp. isolados de *Paullinia cupana* Kunth. var. *sorbilis* (Mart.) Manaus: [s.n.], 2017.**

BIANCHINI, A. Doenças de feijoeiro. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. V. 2. p. 376-399.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333-349.

BIEHLER, K.; FOCK, H. P. Evidence for the contribution of the Mehler peroxidase reaction in dissipation of excess electrons in drought stressed wheat. **Plant Physiology**, v. 112, p. 265-272, 1996.

BITOCCHI, E, N. L. *et al.* Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, p. 788-796, 2012.

BOZKURT, I. A.; SOYLU, S. Determination of responses of different bean cultivars against races of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, causal agent of halo blight of bean. **Euphytica**, v. 179, n. 3, p.417-425, 2011.

BRADFORD, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

GADAGA, S. J. C. **Interação de *Colletotrichum lindemuthianum* com o feijoeiro e a detecção do patógeno em sementes por PCR**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017. p. 72.

CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CHAKRAVORTY, S.; RAYNERA, M. K.; KONINGA, C. B.; VUUREN, S. FOTTERLO, W. A.L. Synthesis and Antimicrobial Activity of the Essential Oil Compounds (E)- and (Z)-3-Hexenyl Nonanoate and Two Analogues. **Short Communication**, v. 65, p. 202-205, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **9º. Levantamento da safra brasileira de grãos 2020/2021**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4234-ultimo-levantamento-da-safra-2020-21-confirma-reducao-na-producao-de-graos>>. Acesso em: 24 set. 2021.

\_\_\_\_\_. **Levantamento da safra brasileira de grãos 2018/2019**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 24 set. 2021.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Produção de grãos-feijão, milho e soja 2020**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3989-producao-de-graos-tem-previsao-de-aumento-de-5-7-chegando-a-271-7-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 17 set. 2021.

CRUZ, A.A. Características morfo-culturais e moleculares de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. Procedentes do Estado do Amazonas. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2014. p. 105.

CTBSF. Comissão Sul Brasileira de Feijão. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2. ed. EPAGRI: Florianópolis, 2012. p. 157.

DALLAGNOL, L. J.; RODRIGUES, F. A.; CHAVES, A. R. M.; VALE, F. X. R.; DAMATTA, F. M. Photosynthesis and sugar concentration are impaired by the defective active silicone uptake in rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. **Plant Pathology**, v. 62, p. 120-129, 2012.

DALLAGNOL, L. J.; RODRIGUES, F. A.; MARTINS, S. C. V.; CAVATTE, P. C.; DAMATTA, F. M. Alterations on Rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. **Australian Plant Pathology**, v. 40, p. 360-365, 2011.

DANIELLI, A. L.; FIALLOS, F. R. G.; TONIN, R. B.; FORCELINI, C. A. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja em função do tratamento químico de sementes e foliar no campo. **Ciencia y Tecnología**, v. 4, n. 2, p. 29-37, 2011.

DAN, G. A. O.; CAI, K.; CHEN, J.; LUO, S.; ZENG, R.; YANG, J.; ZHU, X. Silicon enhances photochemical efficiency and adjusts mineral nutrient absorption in *Magnaporthe oryzae* infected rice plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 675-682, 2011.

DARBEN, L. M. **Identificação de genótipos de feijoeiro comum resistentes à antracnose por meio de avaliação das reações de incompatibilidade e marcadores moleculares SCAR**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

DE PAIVA, S.; MORAES, C. B.; MORAES, W. B.; MOARES, W. B.; ALVARENGA.; DE OLIVEIRA, M.; MUNIZ DE LIMA, A. M. P.; ALVAREZ CABANEZ, P.; MACIEL, K. S.; CARVAJAL VELEZ, N. A.; DE OLIVEIRA, C. A.; SOBREIRA, A. R.; LOPES, J. C. Eficácia do uso de óleos essenciais no tratamento de sementes de feijão inoculadas com o fungo *aspergillus* sp. *In*: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21., 2017, Vale do Paraíba. **Anais [...]**. Vale do Paraíba. *In*: ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 7., 2017. **Anais [...]**. Vale do Paraíba: Universidade do Vale do Paraíba, 2017.

DE RON, A. M.; PAPA, R.; BITOCCHI, E *et al.* Common Bean. *In*: DE RON, A. M. (Ed.). **Grain Legumes**. New York: Springer, 2013. p. 5–36.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 448 p.

DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L.V.; ROMERO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 29-50.

DUARTE, M.C.T. *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.

DUNAEVSKII, Y. E.; TSIBINA, T. A.; BELYAKOVA, G. A.; DOMASH, V. I.; SHARPIO, T. P.; ZABREIKO, S. A.; BELOZERSKII, M. A. Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, p. 344-348, 2005.

EHSANI-MOGHADDAM, B.; CHARLES, M. T.; CARISSE, O.; KHANIZADEH, S. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p.147-153, 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Feijão-comum**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2018.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. IFAD. International Fund for Agricultural Development. UNICEF. Fundo das Nações Unidas para a Infância. WFP. World Food Programme Official. WHO. World Health Organization. The State of Food Security and Nutrition in the World 2020. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2020**. Rome, Italy, 2020. Disponível em : <<https://doi.org/10.4060/ca9692>> Acesso em: 18 set. 2021.

FAOSTAT. Organização de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. **Producción: Cultivos**, 2019.

FEIERABEND, J. Catalases in plants: Molecular and functional properties and role in stress defence. **Online Library, [S.l.]**, 2005.

FENG, R.; WEI, C.; T.U, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany, Elmosford**, v. 87, p. 58–68, 2013.

FERNANDES, W.S. **Respostas de defesa e resistência induzida por ulvana à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)** Dissertação. 2007. 85 p. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FERNÁNDEZ, M.T.; FERNANDEZ M.; CASARES A.; RODRIGUEZ, R.; FUEYO, M. Bean germplasm evaluation for anthracnose resistance and characterization of agronomic traits: A new physiological strain of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L. in Spain. **Euphytica**, v. 114, p. 143-149, 2000.

FIGUEIRÓ, A. A. *et al.* Análise do transcriptoma da cultivar de aveia URS 21, parcialmente resistente à ferrugem da folha, na interação *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 2013, 33,. Pelotas. **Anais [...]**, Pelotas, 2013.

FORNEY, C.F.; JORDAN, M.A.; CAMPBELL-PALMER, L.; FILLMORE, S.; McRAE, K.; BEST, K. Sulfur fertilization affects onion quality and flavor chemistry during storage. **Acta Horticulture**, v. 877, p.163-168, 2010.

FRIEND, J. Plant phenolics, lignification and plant disease. Progress in **Phytochemistry**, v. 7, p. 197-261, 1981.

GADAGA, S. J. C.; SIQUEIRA, C. D. A. S.; MACHADO, J. D. A. C. Transmission potential of *Colletotrichum lindemuthianum* (Race 65) in association with bean seeds under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, v. 42, p. 1–9, 2020.

GAVIRIA-HERNÁNDEZ, V.; ZABOT, G.; PINEL-ALVAREZ, M. F.; ALVES, M.; FERREIRA-ANTUNES, I.; DE FARIAS, C. R. J. Brazilian Journal of Development. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 11, p. 88300–88315. 2020.

GALLI, J. A.; PANIZZI, C. de.; VIEIRA, R. D. Resistência de variedades de soja à morte de plântulas causada por *Colletotrichum truncatum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 2, p. 163-165, 2007.

GARCIA, L. C.; JUSTIANO, A.; RAMOS, H. H. Análise da pulverização de um fungicida na cultura de feijão, em função do tipo de ponta e do volume aplicado. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p.291-295, 2002.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2000. p. 78.

GIANNOPOLITIS, I.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. Based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v. 96, p. 982-992. 2006.

GRATAO, P. L.; POLLE, A. Making the life of heavy-metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Australia, n. 32, p. 481-494, 2005.

GUERRERO, B.; LLUGANY, M.; PALACIOS, O.; VALIENTE, M. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 83, p. 300–307, 2014.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for the detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67 p. 597–607, 1975.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, n. 3, p. 1704-1721, Dec. 2011.

KIKOT, G. E.; HOURS, R. A.; ALCONADA, T. M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. **Journal Basic Microbiology**, v. 49 p. 231–241, 2009.

KORDALI, S. *et al.* Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. **Allelopathy Journal**, v.19, n.2, p.373-91, 2007.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspecto fisiológico, bioquímico e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140 p. Tese (Doutorado) - Escola superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007, p. 140.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnol Food Sci**, v. 80, n. 2, p. 97-108, 2016.

KUMUDINI S.; PRIOR E.; OMIELAN J.; TOLLENAAR M.; Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. **Crop Science**, v. 48, p. 2343-2350, 2008.

LEBEDA, A. *et al.* The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions: review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.108, p. 89-111, 2001.

LENARDÃO, E. J.; SILVA, W. P.; JACOB, R.G.; MAIA, D.S.V.; GOLBECK, C.J.; FONSECA, S. F. Semi-synthetic compounds as antimicrobial agents in food preservation. **Formatex**, p. 576-583, 2015.

LIMA, FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.

LOVATO, F.; KOWALESKI, J.; SILVA, S.Z.; HELDT, L.F.S. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biofortificado (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian journal of food technology**, v. 21, p. 2017068, 2018.

LUBAINA A. S.; MURUGAN, K. Ultrastructural changes and oxidative stress markers in selvagem e cultivar. *Sesamum orientale* L. Após *Alternaria* sesame (Kawamura) Mohanty e Behera. Inoculação. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 51: p. 670–680, 2013.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. p. 107.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. p. 138.

MACHADO, J. C.; SOUZA, R. M. Tratamento de sementes de hortaliças para controle de patógenos: princípios e aplicações. *In*: NASCIMENTO, W.M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. p. 247-272.

MARCENARO, D.; VALKONEN, J. P.T. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. **Plos One**, v.11, n.12, p.1-18, 2016.

MARCHI, C.E., BORGES, M.F., MIZUBUTI, E.S.G. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 45 -352, 2006.

MARTÍNEZ-PACHECO, M. M.; SAUCEDO-LUNA, J.; FLORES-GARCÍA, A.; MARTÍNEZ-MUÑOZ, R.E.; CAMPOS-GARCÍA, J. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Scrib. is a potential cellulases producer microorganism. **Review of Latino America Microbiology**, v. 51, p. 23-31, 2009.

McCONNELL, M.; MAMIDI, S.; LEE, R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M. et al. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) **Theor Appl Genet.**, v. 121, p.1103–1116, 2010.

McCONNELL, M. et al. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 121, p. 1103-1116, 2010.

MEYER, S.; SACCARDY-ADJI, F.; RIZZA, F.; GENTY, B. Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 947-955, 2001.

MIGLIORINI, P. **Recobrimento de sementes com silício e seu efeito no desenvolvimento da antracnose e murcha de Fusarium na cultura do feijão**. 2018. 123 p. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2018.

MONDO, V.H.V.; NASCENTE, A.S.; CARDOSO NETO, M.O. Common bean seed vigor affecting crop grain yield. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p.365-370, 2016.

NOETZOLD, R.; ALVES, M.C.; CASSETARI-NETO, D.; MACHADO, A.Q Variabilidade espacial de *Colletotrichum truncatum* em campo de soja sob três níveis de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p.16-23,2014.

OLANDA, G. B. de. **Uso de plantas bioativas no controle da antracnose na cultura do feijão**. 2014. 52 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, 2014.

OLIVEIRA, M. S. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 557-563, 2006.

OLIVEIRA, S.; BRUNES, A.P.; LEMES, E.S.; TAVARES, L.C.; MENEGHELLO, G.E.; LEITZKE, I.D.; MENDONÇA, A.O. Tratamento de sementes de arroz com silício e qualidade fisiológica das sementes. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 202-209, 2016.

ORTONEDA M, GUARRO J, MADRID MP, CARACUEL Z, RONCERO MI, MAYAYO E, DI PIETRO A. *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. **Infection and Immunity**. 2004; 72: 1760-66.

ONOFRE, S.B. *et al.* Amylolytic enzymes produced by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* in rice semi-solid fermentation. **Journal of Yeast and Fungal Research**, Bangkok, v. 2, n. 3, p. 28-32, mar. 2011.

PADDER, B. A. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017.

PADDER, B.A.; SHARMA, P.N.; AWALE, H.E.; KELLY, J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317-330, 2017.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 5 ed. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2018. V. 1. p. 423-452.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. *In*: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. v. 1, p. 417-453.

PASCHOLATTI, S.F. Fitopatogenos: Arzenal Enzimático. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. Piracicaba, SP: Agronômica Ceres, 2011. p. 647-666.

PASTOR-CORRALES M.; TU J.C. Anthracnose. *In*: SCHWARTZ H.F., PASTOR-CORRALES, M.A. (Eds.). **Bean Production Problems in Tropics**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1989. p. 77-104.

PATEL, P. K.; HEMANTARANJAN, A.; SARMA, B. K.; SINGH R. Growth and antioxidant system under drought stress in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as sustained by salicylic acid. **J Stress Physiol Biochem**, v. 7 p. 130-144, 2011.

PEREIRA, GOULART, AUGUSTO CESAR. Fungos em sementes de soja; detecção, importância e controle. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

PEREIRA, H. S.; FARIA, L.C.; WENDLAND, A.; COSTA, J.G.C.C.; SOUZA, T.L.P.O.; MELO, L.C. Genotype by environment interaction for disease resistance and other important agronomic traits supporting the indication of common bean cultivars. **Euphytica**, v. 214, n. 12. p. 1-11, 2018.

RAMOS, S. J.; RUTZKE, M. A.; HAYES, R. J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; LI, L. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **Planta**, Berlin, v. 233, n. 4, p. 649–660, 2011.

RAVA, C. A., PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de Patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorreram em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p. 167-172, 1994.

Redman, R.S.; Rodriguez, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, p.1427–1434, 2002.

REY, M. S.; LIMA, N. B.; DOS SANTOS, J.; PIEROBOM, C. R. Transmissão semente/plântula de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.3, p. 465-470, 2009.

RIBEIRO, T. *et al.* Classification of *Colletotrichum lindemuthianum* races in differential cultivars of common bean. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 2, p.179, 2016.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 205-211. 2004.

RUFINO, C.A.; TAVARES, E.C.; RAMOS, P.M.; VIEIRA, J.F.; ABREU JUNIOR, J.S.; SILVA, F.J.A.; CORREA, M.F.; GIL, J.M. Performance of soybean seedlings upon nutrient application by seed coating. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 60, p.1-11, 2017.

SILVA, M. R.D.; POLETINE, J.; SILVA, A.F.M.; SAPIA, J.G.; MACIEL, C.D.G. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijoeiro comum em municípios do estado do Paraná. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 2, n. 2, p. 118–131, 2013.

SILVA, M.C. A. **Caracterização morfológica, atividade enzimática e processo inicial de colonização de *Colletotrichum guaranicola* patogênico e endofítico.** 2016. 133 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2016.

SIQUEIRA, F. P.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. SA wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **Phytochemistry**, v. 69 n.12, p. 2297-2302, 2008.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n.1, p. 18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. **Plant Physiology**, v. 2, p. 320–345, 2004.

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

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, Cambridge, v.18, p. 448- 459, 2001.

TOZZE, J. H. J. **Antracnose do abacateiro: danos pós-colheita, caracterização do agente causal, quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos e controle químico**. 2012. 124 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

TU, J.C. *Colletotrichum*: **Biology, Pathology and Control: *Colletotrichum lindemuthianum* on Bean**. Population Dynamics of the Pathogen and Breeding for Resistance (BAILY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). CAB. International, Wallingford, 1992. p. 203-224.

VANITHA S. C.; NIRANJANA, S. R.; UMESHA, S. *et al.* Role of Phenylalanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase in Host Resistance to Bacterial Wilt of Tomato. **Journal of Phytopathology, Índia**, Department of Applied Botany and Biotechnology, University of Mysore, Mysore, India, 04 ago. 2009.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N.; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; LEVY, C.M.A.; COURI, S.; BON, E.P. 2008. *IN*: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p. 273-286.

VIEIRA, C.; JÚNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. **Feijão**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 600 p.

VIEIRA, M. G Estudos da biorredução de compostos carbônicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp. 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

WANG, M.Y.; WEST, B.J. JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A.K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n.12, p.1127-1141, 2010.

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMAH. C. Defensive responses in groundnut against chewing and sap-sucking insects. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 32, p. 259-272, 2013.

WULFF, N.A.; CARRER, H.; PASCHOLATE, S.F. 2006. Expression and purification of cellulose Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 53, p. 198-203.

YING, C.M.; AZLAN, A.; AL-SHERAJI, SH.; HASSAN, F. A. E.; PRASAD, K. N. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico total em extratos de leguminosas germinadas e não germinadas após hidrólise ácida alcalina. **Pakistan Journal of Nutrition**, n.12, v. 12, p.1036-1041, 2013.