

Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*

Carla Giovane Ávila Moreira¹; Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada¹; Solange Maria Bonaldo¹; José Renato Stangarlin²; Maria Eugênia da Silva Cruz¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM/PR), Av. Colombo, 5790, CEP 87.020-200, Maringá, PR, e-mail: schwan@wnet.com.br; ²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 1008, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon.; *Dissertação do primeiro autor apresentada à Universidade Estadual de Maringá (UEM/PR).

Autor para correspondência: Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Data de chegada: 10/07/2006. Aceito para publicação em: 15/05/2008

1384

RESUMO

Moreira, C.G.A.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Bonaldo, S.M.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium* *Summa Phytopathologica*, v.34, n.4, p.332-337, 2008

Plantas medicinais apresentam potencial para o controle de fitopatógenos devido ao efeito direto sobre o agente patogênico ou indireto pela ativação de mecanismos de defesa como as fitoalexinas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito antifúngico e elicitor de frações obtidas da citronela (*Cymbopogon nardus*), a partir dos extratos brutos metanólico (EME) e etanólico (EET) dessa planta. Os extratos EME e EET foram fracionados em cromatógrafo de coluna de filtração em gel (CFG) obtendo-se três frações a partir do extrato metanólico (FMI, FMII e FMIII) e duas frações para o extrato etanólico (FEI e FEII). Os pesos moleculares para as frações FMI, FMII, FMIII, FEI e FEII foram 69,29; 40,51; 18,72; 65,89 e 24,11 kDa, respectivamente. As frações obtidas nas CFG foram utilizadas em bioensaios de germinação de esporos e formação de apressórios por

Colletotrichum lagenarium e, de indução de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja. Observou-se que não houve efeito significativo das frações de EME e EET analisadas sobre a germinação e formação de apressórios pelo patógeno. Quanto ao acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja, não houve efeito significativo das frações FMI, FMII, FMIII, FEI e FEII. Entretanto, observou-se efeito significativo das frações obtidas na CFG, sobre a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, onde os maiores acúmulos destas fitoalexinas foram promovidas pelas frações FMI e FMIII, diferindo significativamente do tratamento controle. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que frações parcialmente purificadas obtidas de EME de *C. nardus* apresentam potencial para induzir o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Palavras-chave adicionais: mesocótilos, cotilédones, gliceolina, deoxiantocianidinas, citronela.

ABSTRACT

Moreira, C.G.A.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Bonaldo, S.M.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S. Partial characterization of fractions from extracts of *Cymbopogon nardus* with elicitor activity of phytoalexins in sorghum and soy and effect on *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.4, p.332-337, 2008

Medicinal plants present potential to control phytopathogens due to the direct effect or by the activation of defense mechanisms like phytoalexins. Then, the present work had the objective to verify the antifungal and elicitor effect of citronella (*Cymbopogon nardus*) obtained from methanolic and ethanolic extracts. It was studied the accumulation of phytoalexins in the mesocotyls of sorghum and in cotyledon of soybean, in response to application of fractions from crude extracts methanolic (EME) and ethanolic extracts (EET) of citronella. The EME and EET extracts were fractioned by gel filtration chromatography (CFG) and three fractions were obtained from the methanolic extract (FMI, FMII and FMIII), and two fractions from the ethanolic extract (FEI and FEII). The molecular weight for the FMI, FMII, FMIII, FEI and FEII were 69.29, 40.51, 18.72, 65.89 and 24.11 kDa, respectively. The fractions obtained from the CFG

were used in a bioassay of germination of *C. lagenarium* spores and of induction of phytoalexins in the mesocotyls of sorghum and cotyledon of soybean. There was no significant effect of the fractions EME and EET on germination and appressorium formation by the pathogen. In the accumulation of phytoalexins in soybean cotyledons there was no significant effect of the fractions FMI, FMII, FMIII, FEI and FEII. However, it was detected a significant effect of fractions obtained by CFG on the production of phytoalexins in mesocotyls of sorghum. The highest accumulation of phytoalexin in mesocotyls of sorghum was obtained in the FMI and FMIII fractions, which differed significantly to the control. Based on the obtained results, it is possible to conclude that fractions partially purified obtained from EME of *C. nardus* present potential to induce phytoalexins in sorghum mesocotyls.

Keywords: mesocotyls, cotyledon, glyceolin, deoxyanthocyanidin, citronella.

Com o desenvolvimento da agricultura tornou-se prática comum o uso indiscriminado de produtos químicos, buscando dar ao agricultor a certeza de uma boa produção, eliminando-se as preocupações com doenças que afetam determinadas culturas. Deste modo, relegaram-se a segundo plano práticas importantes de controle de doenças de plantas tais como a rotação de cultura, uso de sementes livres de patógenos, aração profunda, desinfecção de ferramentas e utensílios, entre outras. Como resultados do uso intensivo de defensivos agrícolas aumentaram os custos de produção da cultura e, ao mesmo tempo, essa prática tornou-se um sério instrumento de desequilíbrio ecológico, além de ocasionar gradativa contaminação do lençol freático.

Assim como outros fungos, *Colletotrichum* sp, agente causal da antracnose em curcubitáceas, é controlado principalmente pela aplicação de fungicidas. Fungicidas não biodegradáveis acumulam-se no solo e interferem na cadeia alimentar (8) e, ao longo do tempo, tornam-se ineficientes, pois tem favorecido a seleção de raças resistentes de patógenos a estas substâncias químicas (7). Além disto, a maioria dos agricultores, por falta de conhecimento ou de treinamento, não respeitam os prazos de carência na aplicação dos agrotóxicos, pulverizando as frutas e verduras até o momento de serem comercializadas colocando em risco sua própria saúde e dos demais consumidores (17). Isto tem levado à busca de medidas alternativas para o controle de fitopatógenos para atender, principalmente, os agricultores que utilizam sistemas agroecológicos de plantio.

Como método de controle alternativo, as plantas medicinais (ou bioativas) atualmente são estudadas, em função de não apresentarem risco ambiental, serem geralmente inócuas aos animais e seres humanos, bem como apresentam menor custo. Diversos trabalhos têm demonstrado a utilização de plantas medicinais e seus subprodutos, no controle direto de fitopatógenos como, por exemplo, no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e *Ralstonia solanacearum* (9); *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (16); bactérias gram positivas e negativas patogênicas ao homem e animais (5); *Rhizoctonia solani* Kuhn (1); na inibição do crescimento dos fungos *Rhizopus* sp., *Ustilago maydis* (DC.), *Ustilaginoidea virens* (Cke.) Tak e *Curvularia lunata* (Wakker) Boedjin (2); inibição do crescimento micelial de *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm (6), e na inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. *sp. phaseoli* (Burkholder), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e *R. solani* (15). Além de apresentarem atividade antimicrobiana, os extratos e óleos essenciais podem atuar como elicitores na indução de fitoalexinas. As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular e produzido pela planta em respostas a estresses físicos, químicos ou biológicos sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de fitopatógenos (13). Neste sentido, Bonaldo et al. (3) demonstraram o potencial de *Eucalyptus citriodora* Hook no acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja, bem como na indução de resistência local em pepino contra *C. lagenarium* (Pass.) Ellis et Halsted. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de frações, parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel e por cromatografia de camada delgada, a partir de extratos alcoólicos de citronela (*C. nardus* Rendel), na indução de fitoalexinas em sorgo e soja, e na atividade antifúngica sobre *C. lagenarium*.

MATERIALE MÉTODOS

Obtenção do extrato metanólico (EME)

As folhas (200 g) de citronela foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agronomia – Universidade Estadual

de Maringá - e colocadas em frasco âmbar contendo álcool metílico, sendo o volume do álcool o suficiente para cobrir o material, e mantido por sete dias à temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse período, o extrato metanólico foi filtrado em gaze e submetido à evaporação em evaporador rotativo, por 4 horas, aproximadamente, à temperatura de 30°C, seguido da eliminação da água existente a uma temperatura de aproximadamente 75°C, obtendo-se uma pasta escura a partir da qual foram preparadas as diferentes concentrações.

Obtenção do extrato etanólico (EET)

O extrato etanólico de citronela foi obtido de forma semelhante à obtenção do extrato metanólico, porém utilizando-se álcool etílico com solvente extrator. A temperatura para a retirada do etanol foi de aproximadamente 35°C, e para a evaporação da água manteve-se a temperatura de 75°C.

Fracionamento dos extratos alcoólicos

Para se obter informações sobre a constituição da citronela realizou-se cromatografia de filtração em gel (CFG), de acordo com Cooper (4), e cromatografia de camada delgada (CCD). A CCD também foi utilizada para determinação dos constituintes por meio da comparação com padrões conhecidos (nerol e geraniol), presentes no óleo essencial de *C. nardus* (12).

Cromatografia de filtração em gel (CFG)

Os extratos alcoólicos foram fracionados em coluna cromatográfica previamente empacotada com Sephacryl S 100 HR (Sigma), formando um gel de aproximadamente 25 cm³ (4, 12). Para esse fracionamento, foi utilizado um volume de 1 mL da solução do extrato bruto com concentração de 2 mg/mL em álcool correspondente. A coluna foi ajustada para um fluxo de 1 mL/min de Tris-HCl pH 8,0, com auxílio de bomba peristáltica, sendo coletadas alíquotas de 2 mL. As alíquotas foram reunidas de acordo com o perfil de eluição pela absorvância a 280 nm. Essas frações foram utilizadas para o bioensaio de indução de fitoalexinas em sorgo e soja, e na germinação de esporos e na formação de apressórios por *C. lagenarium*.

Cromatografia de camada delgada (CDD)

Os extratos metanólico e etanólico, obtidos conforme já descrito anteriormente, foram submetidos a um fracionamento em placas de sílica flexíveis Whatman 20 x 20, com indicador fluorescente (254 nm), pré-lavadas com hexano: acetato de etila 85:15 (v/v) (4). O perfil cromatográfico da fase móvel utilizada teve como objetivo o fracionamento do extrato, de forma que fosse possível uma completa individualização das frações para obter, posteriormente, apenas o efeito das frações. A fim de se determinar os possíveis compostos que fazem parte do extrato, foram dispensadas alíquotas de 2 mL, preparadas a partir dos extratos etanólico e metanólico, na concentração de 50 mg/mL sobre a placa em local previamente demarcado. O procedimento foi desenvolvido em capela com fluxo de ar. O fracionamento dos extratos foi obtido utilizando-se como fase móvel os solventes hexano:acetato de etila (85:15; v/v). Após a documentação e cálculo do R_f das frações visíveis à luz natural, as placas foram coradas com iodo, com a finalidade de obter coloração das substâncias invisíveis à luz natural que fazem parte do extrato. Após o processo de coloração, foram calculados os R_f e submetidos à comparação com os padrões (nerol e geraniol).

Efeito das frações obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG) no desenvolvimento de *C. lagenarium*, na germinação de

esporos e formação de apressórios.

Alíquotas de 40 µL das frações etanólicas e metanólicas, obtidas conforme já descrito anteriormente, foram dispostas em locais predeterminados em placas de poliestireno e, logo a seguir, foram acrescentados 40 µL da suspensão de esporos de *C. lagenarium*, na concentração de 1×10^5 conídios/mL. Como testemunha, utilizou-se água destilada. A seguir, as placas foram incubadas por 24 horas a 25 °C e sob fotoperíodo. Após 24 horas de incubação, para paralisar a germinação e formação de apressórios, foram adicionados 20 µl do corante azul de algodão, sobre as alíquotas contendo as frações e a suspensão de esporos. A avaliação foi realizada por meio da contagem de esporos germinados com o auxílio de microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foram contados 100 esporos por repetição, num total de cinco repetições, considerando-se como germinados todos os esporos que apresentaram emissão do tubo germinativo, independente do tamanho.

Para o bioensaio com as frações obtidas na CCD, presentes nos EME e EET, foram preparados placas de sílica flexíveis Whatman 20 x 20 cm, sob condições iguais às descritas anteriormente, porém sem serem submetidas à coloração. Sobre as placas, foi aspergida uma suspensão de esporos de *C. lagenarium* ($1,0 \times 10^5$ conídios/mL), desenvolvido em meio Czapek (25°C, fotoperíodo 12h), obtendo-se um filme sob toda a superfície da placa. Estas placas foram mantidas em umidade relativa de 100%, à temperatura de 25°C e luz constante por sete dias para observação de bandas de inibição.

Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo por frações parcialmente purificadas por CFG, a partir de extratos metanólicos e etanólicos de *C. nardus*.

Para verificar a indução de fitoalexinas em soja, sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] foram plantadas em areia esterilizada e mantidas em casa-de-vegetação. Após nove a dez dias, os cotilédones foram destacados, lavados em água destilada, secos e cortados de maneira que formassem um sulco na superfície adaxial do cotilédone. Foram depositados seis cotilédones por placa de Petri com papel de filtro esterilizado e umedecido, sendo cada repetição composta por uma placa, onde cada cotilédone recebeu 40 µL de cada fração obtida na CFG, descrito anteriormente (10, 11, 21). As placas foram mantidas a 25°C no escuro por 20 horas e, após esse período, os cotilédones foram transferidos para um erlenmeyer contendo 15 mL de água destilada esterilizada e mantidos em agitação por uma hora para a extração das fitoalexinas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 285 nm.

Para a produção de fitoalexinas em sorgo (deoxiantocianidinas), sementes de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% por 15 min, em seguida lavadas com água destilada e, secas com papel absorvente, enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas e incubadas em local escuro a 28 °C por quatro dias. Após esse período, as plântulas formadas foram expostas à luz por quatro horas para paralisação do alongamento dos mesocótilos estiolados. Os mesocótilos foram excisados 0,5 cm acima do nó escutelar e colocados em tubos de vidro (3 mesocótilos/tubo) contendo 1 mL de cada fração proveniente da CGF. Este procedimento foi efetuado para cada fração obtida dos EME e EET, e utilizando-se três repetições por tratamento. Os tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25 °C sob luz constante por um período de 60 horas. Após esse período, os mesocótilos foram retirados dos tubos, excisados e descartados os 5 mm basais. A porção superior (2,5 cm), foi pesada, cortada em pequenos fragmentos que foram colocados em tubos contendo 1,4 mL de metanol 80% e mantidos a 4°C por 96 horas com

a finalidade de extrair os pigmentos. A absorbância foi determinada a 480 nm em espectro fotômetro (10, 11).

As ABS_{285nm} e ABS_{480nm} foram avaliadas utilizando-se o programa computacional SAEG, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (14), usando-se o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + Ex_i + C_j + ExC_{ij} + e_{ijk}$

onde:

Y_{ijk} = observação da k-ésima repetição da j-ésima concentração referente ao i-ésimo extrato avaliado;

m = efeito da constante comum a cada observação;

Ex_i = efeito do extrato i (1 = EBA, 2 = EME e 3 = EET);

C_j = efeito da concentração do extrato j (1 = 0, 2 = 10, 3 = 25, 4 = 40 e 5 = 50%);

ExC_{ij} = efeito da interação do j-ésimo nível da concentração com o i-ésimo extrato. e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ijk} , pressupondo NID (0, σ^2).

O efeito da concentração do extrato utilizado foi decomposto utilizando a análise de regressão do programa SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 1998), de acordo com o modelo: $Y_{ij} = b_0 + b_1(C_j - C_m) + b_2(C_j - C_m)^2 + b_3(C_j - C_m)^3 + e_{ij}$

onde:

Y_{ij} = observação referente a j-ésima repetição do i-ésimo nível de concentração do extrato;

b_0 = efeito da constante comum a cada observação;

b_1 = coeficiente linear de regressão da variável Y, em função do nível de concentração do extrato i;

b_2 = coeficiente quadrático de regressão da variável Y, em função do nível de concentração do extrato i;

b_3 = coeficiente cúbico de regressão da variável Y, em função do nível de concentração do extrato i;

C_i = concentração do extrato i (i = 0, 10, 25, 40 e 50%);

C_m = média geral dos níveis de concentração do extrato i;

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ij} , pressupondo NID (0, s^2).

As médias foram submetidas à análise estatística pelo teste de Duncan a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia de filtração em gel (CFG)

Por meio da cromatografia de filtração em gel, as alíquotas foram obtidas e reunidas pelo perfil de eluição e as proteínas monitoradas em $A_{280\text{nm}}$. Obtiveram-se três picos do extrato metanólico (FMI, FMII e FMIII) e dois picos do extrato etanólico (FEI e FEII). Nas Figuras 1 e 2 são observados os picos de absorbância para as frações extraídas com metanol e etanol.

Cromatografia de camada delgada (CDD)

O resultado do fracionamento em CCD dos extratos metanólico e etanólico é apresentado na Figura 3. Pela comparação com os padrões nerol e geraniol foi possível estabelecer os valores de R_f que variaram de 0,01 até 0,34. Estes dados confirmam que a fase móvel utilizada permitiu uma boa separação dos compostos, possibilitando uma melhor visualização das bandas. Além das duas frações correspondentes aos padrões utilizados, foram obtidas mais cinco frações, sendo duas com valores de R_f superiores aos padrões e três com valores inferiores.

Pela comparação dos R_f das frações do EME e EET com os padrões, foi confirmada a existência de nerol e geraniol nestes extratos. Tais resultados estão em acordo com os obtidos por Padetec (12), que mostra a presença destes compostos como sendo os principais

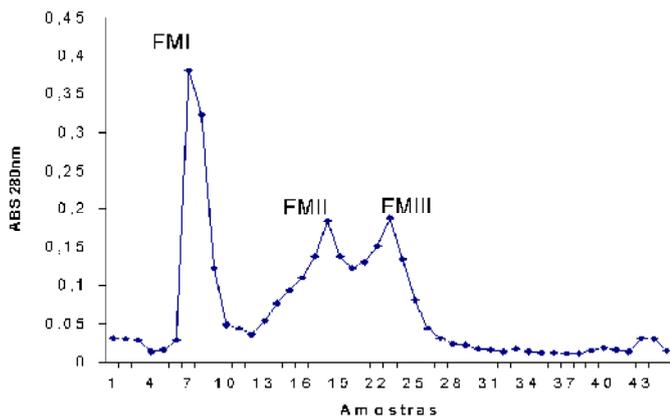


Figura 1. Cromatografia de filtração em gel de extrato metanólico. Amostra de 2 mg do extrato bruto diluída em 1 mL de metanol, aplicada em Sephacryl (Sigma) S-100-HR (1 x 24 cm) e eluídos em Tris HCL. Fluxo de 1 mL/min. FMI: fração metanólica I; FMII: fração metanólica II e FMIII: fração metanólica III.

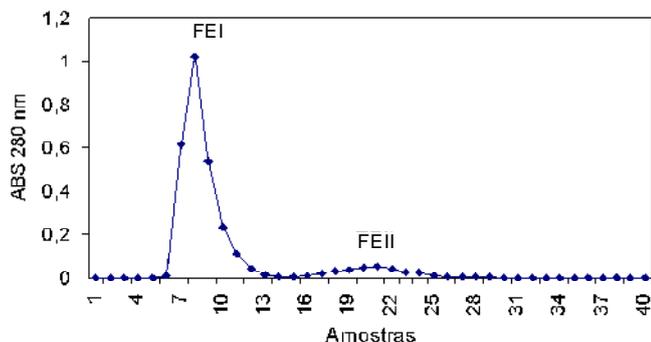


Figura 2. Cromatografia de filtração em gel do extrato etanólico. Amostra de 2 mg do extrato bruto diluída em 1 mL de metanol, aplicada em Sephacryl (Sigma) S-100-HR (1 x 24 cm) e eluídos em Tris HCL. Fluxo de 1 mL/min. FEI: fração etanólica I e FEII: fração etanólica II.

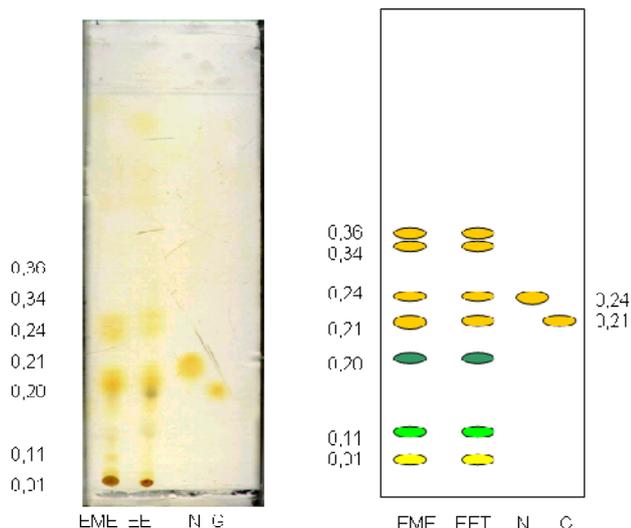


Figura 3. Valores de R_f para a separação em cromatografia de camada delgada. EME: fração extrato metanólica; EET: fração extrato etanólica; N: padrão nerol ($R_f = 0,24$) e G: padrão geraniol ($R_f = 0,21$).

constituintes da citronela.

Na Figura 3, as bandas coradas em verde escuro, verde claro e amarelo correspondem às bandas visíveis à luz natural. As bandas coradas de laranja correspondem às bandas visíveis somente após o uso de revelador (iodo).

Efeito das frações obtidas por cromatografia de filtração em gel (CFG) no desenvolvimento de *C. lagenarium*, na germinação de esporos e formação de apressórios.

Não houve efeito das frações EME e EET, bem como dos padrões (nerol e geraniol) sobre o desenvolvimento do *C. lagenarium* em placa de sílica, pois se observou crescimento micelial do patógeno sem a ocorrência de nenhum halo de inibição. Estes dados diferem de Fiori et al. (6) que verificaram halos de inibição quando aplicada uma suspensão de *Didymella bryoniae* sobre o extrato vegetal de *C. citratus*. Neste trabalho, a diferença dos resultados em relação aos obtidos por Fiori et al. (6) pode estar associada num primeiro contexto por se tratar de plantas de mesmo gênero, porém de espécies diferentes, ou ainda ao método de extração utilizado. Estes autores utilizaram a água como solvente extrator, sendo que no presente trabalho foi utilizado solvente alcoólico.

Na Tabela 1 são apresentadas as médias das germinações dos conídios observadas para as frações provenientes da cromatografia de filtração em gel, obtidas a partir de EME e EET de *C. nardus*, e para o tratamento controle. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) das frações analisadas sobre a germinação e formação de apressórios. Os parâmetros analisados foram esporos germinados sem apressórios (GSAP), germinados com apressórios (GCAP), esporos não germinados (NGER) e a germinação total (GTOT = GSAP + GCAP). Entretanto, pode-se observar que houve redução de esporos germinados sem a formação de apressório em relação ao controle. Esta redução foi de 12% e 10% para as frações FMI e FEII, respectivamente. Os apressórios são estruturas importantes para a penetração do fitopatógeno na planta hospedeira

Wilson et al. (18), utilizando extrato bruto de *C. nardus*, não obtiveram efeito fungitóxico sobre *Botrytis cinerea*. Contudo, efeito fungitóxico foi encontrado pelos mesmos autores quando avaliaram o efeito do óleo essencial de *C. nardus* sobre a germinação de esporos de *B. cinerea* na concentração de 6,25 %.

Tabela 1. Porcentagem da germinação e formação de apressórios por *Colletotrichum lagenarium* na presença de diferentes frações parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel, a partir de extrato bruto de *Cymbopoton nardus*

Tratamentos	GSAP ¹	GCAP ²	NGER ³	GTOT ⁴
FMI ^a	68,04	27,06	4,90	95,10
FMII ^a	80,77	17,10	2,13	97,87
FMIII ^a	72,71	21,98	5,31	94,69
FEI ^b	76,82	20,03	3,15	96,85
FEII ^b	70,30	28,61	1,09	98,91
Controle	80,39	19,61	0,00	100,00

¹Frações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato metanólico.

²Frações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato etanólico.

³GSAP: germinação de esporos sem a formação de apressórios.

⁴GCAP: germinação de esporos com a formação de apressórios.

⁵NGER: esporos não germinados.

⁶GTOT: germinação total de esporos.

Controle: água destilada esterilizada.

Produção de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo por frações parcialmente purificadas por CFG, a partir de extratos metanólico e etanólico de *C. nardus*

Não foi detectado efeito significativo ($P > 0,05$) das concentrações do EBA sobre a indução de fitoalexinas tanto para cotilédone de soja, quanto para mesocótilos de sorgo. Contudo, obteve-se um efeito cúbico significativo ($P < 0,05$) da concentração de EME e EET sobre a produção de fitoalexinas em cotilédone de soja e em mesocótilos de sorgo. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) das frações FMI, FMII, FMIII, FEI e FEII sobre a produção de fitoalexinas em cotilédones de soja. Entretanto, foi detectado um efeito significativo ($P < 0,05$) das frações obtidas na CFG, sobre a produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. As maiores produções de fitoalexina em cotilédone de soja e mesocótilos de sorgo foram obtidas nas frações FMI e FMIII, as quais diferiram significativamente do tratamento controle (Tabelas 2 e 3).

Na Tabela 2 estão às médias de ABS_{285}/gfp em cotilédones de soja, de acordo com as frações obtidas na CFG. Observa-se que as frações obtidas por meio dos extratos alcoólicos não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,5$), entretanto a fração FMIII foi a que apresentou o maior valor de ABS. Pelos valores obtidos, pode-se inferir que estas frações não induzem à produção de fitoalexinas em soja, provavelmente devido ao fato destas frações não conterem molécula(s) necessária(s) para desencadear o processo de produção de gliceolinas, ou

Tabela 2. Acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja por frações parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel, a partir de extratos brutos metanólico ou etanólico de *Cymbopogon nardus*

Tratamentos	Médias (ABS_{285}/gpf)*
FMIII ^a	0,154 a
FMI ^a	0,116 a
FEI ^b	0,109 a
FMII ^a	0,099 a
FEII ^b Controle	0,092 a0,061 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente ($P > 0,5$) pelo teste de Duncan.

* ABS_{285}/gpf (absorbância a 285 nm por grama de peso fresco).

^aFrações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato metanólico.

^bFrações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato etanólico.

Controle: água destilada esterilizada.

Tabela 3. Acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, por frações parcialmente purificadas por cromatografia de filtração em gel, a partir de extratos brutos metanólico ou etanólico de *Cymbopogon nardus*

Tratamentos	Médias
FMIII ^a	16,597a
FMI ^a	15,806a
FEI ^b	13,955ab
FMII ^a	9,678abc
Controle	3,501bc
FEII ^b	0,984c

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente ($P > 0,5$) pelo teste de Duncan.

^aFrações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato metanólico.

^bFrações obtidas na cromatografia de filtração em gel a partir do extrato etanólico.

Controle: água destilada esterilizada.

possivelmente, os métodos utilizados não conseguiram extrair as moléculas elicitoras desta fitoalexina.

Para as fitoalexinas do sorgo (deoxiantocianidinas), a fração FMIII foi também a que apresentou a maior produção da fitoalexinas e a fração FEII a que induziu à menor síntese destas fitoalexinas (Tabela 3).

Quanto ao comportamento das frações etanólicas, os resultados estão de acordo com Wulff e Pascholati (19, 20), pois a fração com maior absorbância (Figura 2) constatada foi a FEI, que também apresentou maior propriedade indutora de fitoalexinas em sorgo diferindo estatisticamente da fração FEII.

Assim, observa-se que frações obtidas de extratos metanólicos e etanólicos de citronela não possuem atividade fungitóxica direta contra *C. lagenarium*, nem atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja; porém, as frações FMI e FMIII apresentam atividade elicitora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Portanto, estudos futuros devem ser realizados para avaliar o potencial das frações FMI e FMIII na proteção de plantas de sorgo, bem como a caracterização da molécula elicitora presente nestas frações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ansari, M.M. Control of sheath blight of rice by plant extracts. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 48, p. 268-270, 1995.
2. Awuah, R.T. Fungitoxic effects of extracts from some west african plants. **Annual Applied Biology**, Warwick - UK, v. 115, p.451-453, 1989.
3. Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Tessmann, D.J.; Scapim, C.A. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.128-134, 2004.
4. Cooper, T.G. **The tools of biochemistry**. New York: Jonh Wiley & Sons, 1977. 413p.
5. El-Hamali, H.H. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 19, n.1, p. 77-78, 1998.
6. Fiori, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Vida, J.B.; Scapim, C.A.; Cruz, M.E.S.; Pascholati, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 148, p.483-487, 2000.
7. Ghini, R.; Kimati, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.
8. Harkaly, A. Perspectivas da agricultura orgânica no mercado internacional. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 35; CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HORTICULTURA, 7; 1995, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Olericultura, 1995. p.47-50.
9. Motoyama, M.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Fiori, A.C.G.; Scapim, C.A. Efeito antimicrobiano de extratos cítricos sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 509-512, 2003.
10. Nicholson, R.L., Kollipara, S.S., Vincent, J.R., Lyons, P.C.; Cadena-Gomez, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 84, p.5520-5524. 1987
11. Nicholson, R.L., Jamil, F.F., Snyder, B.A., Lue, W.L.; Hispkind, J. Phytoalexin synthesis in the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 33, p.271-278, 1988.
12. PADETEC. **Essential oils from brazilian plants**. Fortaleza: UFCE, 1998. CD-ROM.

13. Pascholati, S.F.; Leite, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. 1995. pp. 417-454.
14. Universidade Federal de Viçosa. **SAEG-Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998.
15. Valarini, P.J.; Frighetto, R.T.S.; Melo, I.S. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista da Agricultura**, Piracicaba, v. 69, p.139-150, 1994.
16. Vigo-Schultz, S. C.; Stangarlin, J.R.; Franzener, G.; Portz, R.L.; Kuhn, O.J.; Schwan-Estrada, K.R.F. Avaliação da eficácia da tinctura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, 2006
17. Waichman, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v.38, p. 45-50, 2008.
18. Wilson, C.L.; Solar, J.M.; El Ghaouth, A.; Wisniewski, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cineria*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 204-210, 1997.
19. Wulff, N. A.; Pascholati, S. F. Partial Characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - DF, v. 24, p. 428-435, 1999
20. Wulff, N. A.; Pascholati, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesócotilos de sorgo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 138-143, 1998
21. Ziegler, E.; Pontzen, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, London, v.20, p. 321-331, 1982.