



ÉRIKA OLIVEIRA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA
PINTA BACTERIANA (*Pseudomonas syringae* pv.
tomato) DO TOMATEIRO – ÉPOCAS DE
APLICAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E INDUÇÃO
DE RESISTÊNCIA.**

**LAVRAS - MG
2015**

ÉRIKA OLIVEIRA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA
(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) DO TOMATEIRO – ÉPOCAS DE
APLICAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para a
obtenção do título de Mestre

Orientador: Dr. Eduardo Alves

**LAVRAS-MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

da Silva, Érika Oliveira.

Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana (*pseudomonas syringae* pv. *tomato*) do tomateiro - épocas de aplicação, concentração e indução de resistência / Érika Oliveira da Silva. –
Lavras : UFLA, 2015.

68 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Controle Alternativo. 2. *Solanum lycopersicum*. 3. Análise
Bioquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD -

ERIKA OLIVEIRA DA SILVA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA PINTA BACTERIANA
(*Pseudomonas syringae pv. tomato*) DO TOMATEIRO – ÉPOCAS DE
APLICAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 20 de fevereiro de 2015

Dr. Eduardo Alves - UFLA

Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes - UFLA

Dr. Hudson Teixeira- EPAMIG

Prof. Dr. Eduardo Alves
(Orientador)

**LAVRAS – MG
2015**

Ao meu avô Ordello da Silva (*in memoriam*), que andava descalço e, com toda sua simplicidade e conhecimento, me ensinou que precisamos de pouco para nossa trajetória terrena.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por me conceder capacidade suficiente para desenvolver minhas atividades na pós graduação.

À minha família que mesmo longe sempre se fizeram presentes nos bons e maus momentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade da realização deste curso.

Ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela oportunidade de desenvolver atividades de pesquisas.

Ao Prof. Eduardo Alves pela paciência e orientação e demais co-orientadores pelos ensinamentos e amizade.

Ao meu noivo Diego Lucas Juliatte da Locha, pelo carinho, amizade, companheirismo e cumplicidade.

À todos os meus amigos que fizeram essa estadia de 6 anos e meio ser mais suave e alegre.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho.

EPIGRAFE

“Ninguém vai bater mais forte que a vida. Não importa como você bate, e sim quanto aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha”

Rocky Balboa

RESUMO

A pinta bacteriana tem como agente etiológico a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) e está entre as doenças mais importantes do tomateiro, pois reduz o tamanho dos frutos e a qualidade pelo aparecimento de manchas. As perdas causadas por esta doença resultam da redução da produtividade em decorrência direta dos sintomas, do custo dos produtos químicos utilizados como estratégia de controle e de sua aplicação às lavouras. Os princípios ativos que estão contidos nos produtos registrados no Brasil para o controle da pinta bacteriana são o cobre e os antibióticos estreptomicina e oxitetraciclina. No entanto, vários trabalhos demonstram a baixa eficácia da estreptomicina e dos produtos cúpricos em lavouras de tomate. Assim os óleos essenciais surgem como uma alternativa para o controle da pinta bacteriana. Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de: (i) avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de canela (CA), citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR), tomilho (TO), eucalipto (EU), árvore-de-chá (ME), copaíba (CO) e erva-cidreira (EC); (ii) avaliar o efeito destes óleos e das épocas de sua aplicação no controle da pinta bacteriana; (iii) avaliar a melhor concentração dos óleos essenciais mais promissores para o controle da pinta bacteriana e (iv) avaliar o potencial do óleo essencial de citronela e capim-limão e do acibenzolar-S-metil na redução da pinta bacteriana e na ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa de planta de tomate. Na concentração 1,0%, os óleos essenciais de CA, CI, CL e EU promoveram inibição do crescimento de *Pst in vitro*. Em relação à influência entre épocas de aplicação e controle da doença, a aplicação de óleos essenciais somente uma vez antes da inoculação apresentou maior eficiência de controle. Os melhores tratamentos foram o ASM e os óleos essenciais de CI, CL e TO. Os óleos essenciais de CI 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ e CL 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$, e o ASM 0,2g L^{-1} foram eficientes contra a pinta bacteriana do tomateiro quando aplicados uma única vez sete dias antes da inoculação. O óleo essencial de CI e o acibenzolar-S-metil conferiram capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *P. syringae* pv. *tomato*. Estes também promoveram o aumento na quantidade de fenol total e lignificação da parede celular.

Palavras chave: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Controle Alternativo. *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

The bacterial speck has as etiologic agent the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) and it is among the most important tomato diseases because it reduces the fruit size and quality by the appearance of spots. The losses caused by this disease result from the reduced productivity as a direct result of the symptoms, the cost of chemicals used as control strategy and its application to crops. The active ingredients that are contained in the products registered in Brazil for the control of bacterial speck are copper, streptomycin and oxytetracycline. However, several studies have shown the low efficacy of streptomycin and cupric products in tomato crops. Thus the essential oils appear as an alternative for the control of bacterial specks. As a consequence, this study was conducted with the following objectives: (i) to evaluate the *in vitro* effect of cinnamon (CA), citronella (CI), lemongrass (CL), clove (CR), thyme (TO), eucalyptus (US), tea tree (ME), copaiba (CO) and lemon balm (EC) essential oils; (ii) evaluate the effect of these oils and the seasons of their application in the bacterial speck control (iii) evaluate the best concentration of the most promising essential oils for the bacterial speck control and (iv) evaluate the essential oil potential of citronella, lemon grass and acibenzolar-S-methyl in reducing bacterial specks and in the activation of some plant defense biochemical responses. In the concentration 1.0%, the essential oils of CA, CI, CL and EU promoted *in vitro* *Pst* growth inhibition. Regarding the influence of application times and disease control, the application of essential oils only once before inoculation presented higher control efficiency. The best treatments were the ASM and the essential oils of CI, CL and TO. Essential oils of CI 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ and CL 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$, and ASM 0,2g L^{-1} were effective against tomato bacterial speck when applied only once seven days before inoculation. The essential oil of CI and acibenzolar-S-methyl conferred partial protection capacity in tomato plants challenged by *P. syringae* pv. *tomato*. They also promoted the increase in the total amount of phenol and the cell wall lignification.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Alternative Control. *Solanum lycopersicum*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Óleos essenciais no manejo da pinta bacteriana do tomateiro.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 A pinta bacteriana do tomateiro	15
2.2 Indução de Resistência	17
2.3 Óleos Essenciais no controle de fitopatógenos	21
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2: Épocas de aplicação e concentração de óleos essenciais no controle da pinta bacteriana do tomateiro.	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Locais de Execução dos Experimentos	34
2.2 Preparo das mudas de tomateiro	34
2.3 Origem, isolamento, preservação e inoculação de Pst.....	35
2.4 Composição dos óleos essenciais utilizados nos testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....	35
2.5 Realização dos experimentos	36
2.5.1 Medida do halo de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	36
2.5.2 Avaliação do efeito de duas épocas de aplicação dos óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	37
2.5.3 Efeito de concentrações dos melhores óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

3.1 Medida do halo de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	39
3.2 Avaliação do efeito de duas épocas de aplicação dos óleos essenciais no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	43
3.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	47
4. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO 3: Óleos essenciais de citronela e capim-limão e acibenzolar-S-metil na indução de resistência da pinta bacteriana do tomateiro.	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 Obtenção dos óleos essenciais.....	58
2.2 Origem, isolamento, preservação e Inoculação de <i>Pst</i>	58
2.3 Realização dos experimentos.....	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

CAPÍTULO 1

Óleos essenciais no manejo da pinta bacteriana do tomateiro

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate é uma das hortaliças mais importantes, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, devido ao volume de produção e geração de empregos. A planta é uma espécie cosmopolita, sendo os maiores produtores mundiais a China, Estados Unidos e Índia. O Brasil é o quinto maior produtor, com uma produtividade média duas vezes maior que em outros países, destacando-se como principais produtores Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2013). O fruto é uma fonte importante de vitaminas e sais minerais, além de ser uma cultura comercial importante para pequenos e médios produtores e trata-se de uma das culturas mais comuns no mundo.

A cultura destaca-se por apresentar um amplo histórico de problemas fitossanitários que são responsáveis por perdas significativas na produção. Dentre os principais problemas estão as doenças, entre as quais se destacam: a pinta-preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout (1896); a requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary; a septoriose, causada por *Septoria lycopersici* Speg; as murchas, causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen, *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth e *Ralstonia solanacearum*; o vírus do vira-cabeça do tomateiro, a podridão mole, causada por *Erwinia* spp.; o cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria*; a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e as galhas, causadas por *Meloidogyne* spp (Cordeiro et. al, 1997). De modo geral, as doenças do tomateiro são responsáveis por perdas significativas na produção e, para evitar este problema os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. Este, por sua vez, pode ser realizado de maneira abusiva e

indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (Franzener et al., 2007; CIDASC, 2013).

As decisões dos produtores para a adoção dessas medidas visam, principalmente, minimizar o risco de prejuízos financeiros, uma vez que o custo de implantação e de condução da lavoura é muito alto, além de existir grande pressão no mercado para a venda de produtos químicos (Nascimento et al., 2013).

Neste contexto, tem-se procurado alternativas que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (Zadoks, 1992; Khan & Anwer, 2011; Gaur & Sharmam, 2010). Hoje, existem como medidas alternativas de controle de doenças, o controle biológico, o qual utiliza um microrganismo antagonico que tem ação direta sobre o microrganismo patogênico; os óleos e os extratos de vegetais e a indução de resistência em plantas, que envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes em plantas, em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos (Bettiol, 1991; Gaur & Sharmam, 2010), representados por barreiras bioquímicas ou estruturais, que aumentam a resistência geral da planta (Uknes et al., 1996; Oliveira et al., 1997; Gaur & Sharmam, 2010).

Os óleos essenciais apresentam-se como uma opção na busca pelo controle alternativo, pois possuem em sua composição, substâncias que podem exercer funções importantes na interação planta-patógeno, seja ativando os mecanismos de defesa da planta ou atuando como substâncias fungitóxicas, à semelhança dos fungicidas sintéticos. Os óleos de plantas têm como vantagem o fato de não poluírem o ambiente e serem considerados como alternativa no controle de fitopatógenos (Stangarlin et al., 1999; SOUZA et al., 2007), seja com ação fungitóxica (Fiori et al., 2000; Bonaldo et al., 2004) ou bactericida (Karaman et al., 2003; Kuhn et al., 2006; Vigo-Schultz et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta, por meio de fitoalexinas, peroxidases e

proteínas relacionadas à patogênese (Schwan-Estrada, 2003; Kagade et al., 2004), o que indica a presença de compostos com característica de eliciadores.

Nas células bacterianas, o mecanismo de ação desses compostos provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática (Bakkali et al., 2008). A permeabilidade da membrana da célula é influenciada pela sua composição e da hidrofobicidade dos compostos que a atravessam. Como os óleos essenciais são tipicamente lipofílicos, tendem a se acumular na bicamada lipídica, determinando dessa forma a permeabilidade da estrutura. O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais provoca alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (Pasqua et al., 2007). Dessa forma, a resistência bacteriana a óleos essenciais pode estar ligada à habilidade de partição dos seus componentes na fase lipídica da membrana plasmática. Sua permeabilidade, em bactérias, está relacionada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico e à perda de metabólitos e íons, como os de potássio e fosfato (Bakkaliet al., 2008). Sendo assim, danos causados à membrana levam ao comprometimento de suas funções, como barreira seletiva, ação de enzimas e geração de energia.

A determinação da atividade biológica desses compostos, em relação à sua atividade eliciadora ou antimicrobiana, pode contribuir para a aquisição de maiores conhecimentos para reforçar sua possível utilização como medida alternativa de controle para doenças de plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A pinta bacteriana do tomateiro

A pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) foi assinalada no Brasil em 1959, porém causou graves prejuízos somente a partir de meados da década de 70, decorrente das mudanças de tratos culturais e pela substituição de variedades que eram até então empregadas. Essa bactéria pode reduzir a qualidade e o rendimento na produção afetando mercado de tomates frescos e transformados (Varvaro, 2006).

Pst é uma bactéria baciliforme, gram-negativa, aeróbica que se move por meio de flagelos polares. As colônias, em meio de extrato de carne são esbranquiçadas, e em meio King B elas produzem pigmentos fluorescentes (Kimati, 1997). Assim como outros patógenos bacterianos, *Pst* sobrevive preferencialmente em locais da folha tais como depressões entre câmaras sub-estomáticas, células epidérmicas e em torno de tricomas (Varvaro, 2006). Esta bactéria pode se encontrar presente nos restos culturais de culturas anteriores, no solo e até mesmo nas próprias sementes, sendo ainda que sua disseminação pode ocorrer pela água da chuva e vento, que ao transportar gotículas de água podem levar o agente patogênico consigo (Young et al., 1996). Embora esta doença não leve a perdas totais da planta, os sintomas no fruto podem reduzir a possibilidade de comercialização (Herman, 2008).

A doença ataca toda a parte aérea das plantas. Primeiramente, é observada nas folhas na qual ocasiona lesões escuras de 2-3 mm de diâmetro. Nas hastes, os sintomas se assemelham, porém não se nota a presença do halo clorótico. Os sintomas se caracterizam mais nos frutos, ocasionando lesões superficiais, puntiformes e escuras que podem ser arrancadas com a unha, raramente excedendo 1mm. Nas mudas ocorre desfolha e queda dos cotilédones, além de retardar o crescimento vegetativo (Junior, 2005).

Os danos causados por esta bactéria podem diminuir a produção em até trinta por cento (Silva & Lopes, 1995). Porém, estes só serão significativos com a ocorrência de elevada desfolha e ataque aos órgãos florais, que resultam no

abortamento das flores. Ressalta-se que a qualidade visual dos frutos mesmo não afetando a polpa do mesmo é desta forma também prejudicada (Young et al, 1996).

A bactéria pode permanecer viável em mudas ou sementes infectadas por até 20 anos, o que torna a busca por material propagativo sadio ou isento de patógenos um dos fatores que aumenta a produtividade. Em relação à sobrevivência dessa bactéria no solo, dependendo da existência de restos culturais pode atingir vários meses, caso contrário, sua permanência é curta no solo. Quando prevalecer condições desfavoráveis para a infecção, pode existir no solo como residente (Junior, 2005).

Para o controle da pinta bacteriana, recomenda-se o uso de variedades com resistência conferida pelo gene *Pto*, presente, por exemplo na cultivar BRS Tospodoro (Embrapa, 2010; Pilowsky; Zutra, 1986; Stockinger; Walling, 1994); evitar o plantio de mudas com sintomas da doença, principalmente, nos períodos mais propícios à sua ocorrência (Silva et al., 2002); utilização de sementes e mudas saudáveis, controle da irrigação, visto que bactérias fitopatogênicas são extremamente dependentes de alta umidade para sua multiplicação e/ou disseminação; preferir irrigação em sulco, pois desfavorece a disseminação de patógenos foliares, em comparação com irrigação por aspersão (Junior, 2005); escolha do local e época de plantio; práticas culturais que desfavoreça o patógeno; controle alternativo; controle químico e controle biológico (Junior, 2005), ressaltando que o controle químico, todavia coloca em risco a saúde do agricultor, uma vez que o tomate é colhido diariamente e não se obedece aos períodos de carência (Abreu, 2006; Gaur & Sharmam, 2010).

2.2 Indução de Resistência

A indução de resistência é definida como o aumento da capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de organismos fitopatogênicos

incluindo fungos, bactérias e vírus (Van Loon, 1998; Romeiro, 2008). A resistência resultante é proporcionada por um agente indutor (biótico ou abiótico) que aciona mecanismos de defesa na planta os quais se encontram na forma latente (Hammer Schmidt & Kúc, 1982). Essa ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos, ou seja, formas avirulentas de patógenos, raças incompatíveis, em determinadas circunstâncias por formas virulentas de patógenos, extratos e óleos vegetais, extratos de fungos (Stangarlin & Pascholati, 1997; Stadnik, 1999) ou por ativadores químicos, como o ácido aminobutírico (Cohen, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico e acibenzolar-S-metil (Ciba, 1995).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (Oliveira et al., 1997). Esta resistência é expressa localmente no sítio de ataque do patógeno e sistemicamente em partes não infectadas da planta, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador). A sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou mesmo durar todo o ciclo de vida da planta, passando assim a funcionar como um mecanismo de defesa constitutivo da planta (Pascholati & Leite, 1995). Os mecanismos de defesa envolvidos incluem a combinação de mudanças físicas, tais como a lignificação da parede celular, formação de papilas ou indução de várias proteínas relacionadas à patogênese (Van Loon et al., 1998).

Alguns autores dividem a RI em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (Sticher et al., 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (Van Loon et al., 1998).

A ativação das defesas naturais da planta através da RSA é uma das estratégias para o controle da pinta bacteriana (Louws et al., 2001), onde moléculas eliciadoras podem ativar resistência sistêmica, que protege os tecidos

contra o ataque subsequente de uma ampla variedade de patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RSA é expressa tanto local quanto sistemicamente, em resposta a patógenos que causam lesões necróticas (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo tiadiazol-7-carbotióico (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) que muitas vezes possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammer Schmidt & Smith-Becker, 1999), e é mediada por um processo dependente do ácido salicílico. Outros processos de defesa podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (Durrant & Dong, 2004). Já na RSI, induzida por rizobactérias, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno (Van Loon et al., 1998).

Dentre as PRPs, as quitinases e β -1,3 glucanases despertam mais interesse na interação plantas e fungos, pois as quitinases atuam hidrolisando a quitina que é um polímero de β -1,4-N-acetil-glicosamina constituinte da parede celular de fungos (Chlan & Bourgeois, 2001) e, apresenta ação antibacteriana em razão, fundamentalmente, de sua ação lisozímica sobre a parede celular (Stintzi et al., 1993). As β -1,3 glucanases atuam hidrolisando β -glucanos, oligossacarídeos com ligações glicosídicas tipo β -1,3 e β -1,6 glicosil, também componentes da parede celular de fungos (Chung et al., 1997). Outras PR-proteínas muito estudadas são as peroxidases, cuja atividade é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções destas enzimas (Cakmak & Horst, 1991). A oxidação de álcoois hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina, é catalisada por peroxidases, resultando na produção de radicais fenoxi-

mesoméricos que reagem espontaneamente durante a deposição de lignina na parede celular, aumentando sua resistência (Peixoto, 1998).

O primeiro relato de indução de resistência foi descrito por Ray & Beauverie em 1901, os quais obtiveram indução de resistência em begônia pelo uso de esporos atenuados de *Botrytis cinerea* relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. Quase trinta anos mais tarde, Carbonne & Kalaljev confirmaram esse estudo e mostraram que a resistência sistêmica adquirida depende da condição do hospedeiro. Em 1933, Chester observou que plantas susceptíveis podiam adquirir resistência após o primeiro contato com o patógeno avirulento ou após inoculação com forma atenuada do agente patogênico (Kessmann et al., 1994). A partir desses trabalhos pioneiros, pesquisas com indução de resistência foram se multiplicando pelo mundo, com as mais diversas culturas (Terry & Joyce, 2004). No Brasil, os primeiros estudos foram desenvolvidos em 1970, no Instituto Biológico de São Paulo, pela Dra. Walkyria B.C. Moraes, contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis* e urediniosporos inativados de *H. vastatrix* (Bonaldo et al., 2005).

Diversos trabalhos enfatizam a existência de substâncias bioativas em extratos vegetais, que proporcionam a ativação do sistema de defesa das plantas contra patógenos, tais como: *Phoma* sp. (Barguil et al., 2005), *Cercospora coffeicola*, Berk & Cooke (Santos et al., 2007) e *Hemileia vastatrix* Berk & Cooke em cafeeiro (Santos et al., 2007), além de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye em tomateiro (Cavalcanti et al., 2006) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomateiro (Silva et al, 2014).

Cavalcanti et al. (2006), ao tratar plantas de tomateiro com acibenzolar-S-metil (ASM), formulação biológica proveniente de biomassa cítrica (Ecolife®), suspensão de quitosana proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso* (MCp) e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*)

infectadas por *Crinipellis pernicioso*, quatro dias antes da inoculação de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, obtiveram redução da mancha bacteriana em casa de vegetação.

2.3 Óleos Essenciais no controle de fitopatógenos

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias das plantas e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Simões; Spitzer, 2004). Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (Simões et al., 2004). Na natureza, óleos essenciais exercem importante papel na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Podem agir também atraindo insetos para favorecer a dispersão de pólenes e sementes ou repelir aqueles indesejáveis.

Os óleos essenciais são substâncias geralmente obtidas de partes de plantas por meio de destilação por arraste de vapor d'água, entre outros métodos. Seus constituintes são complexos e variáveis, entre os quais se destacam aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 carbonos e sesquiterpenos, com 15 carbonos. Possuem características peculiares odoríferas, lipofílicas, líquidas e voláteis, sendo conhecidos também como óleos voláteis, etéreos ou essências (Simões et al., 1999).

As plantas medicinais e aromáticas, de modo geral, têm, em sua composição, substâncias capazes de exercer funções importantes na interação planta-patógeno, seja por ação fungitóxica (Oliveira, 2010), bactericida (Vigo Schultz et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta (Pereira et

al., 2008) por meio da produção de fitoalexinas, aumento da atividade de PRPs e da síntese de outros compostos bioquímicos e estruturais de defesa da planta (Balbi-Peña et al., 2006).

Costa et al (2010), observaram que o óleo essencial de citronela proporciona maior efeito no controle de *Erwinia carotovora*, com halos de inibição maiores do que a tetraciclina. A concentração inibitória mínima do óleo essencial de citronela a 1% apresentou alta eficiência sobre essa bactéria.

Silva et al (2014) ao analisarem o efeito de diversos óleos essenciais sobre a bactéria Pst, verificaram que no ensaio *in vitro* os óleos essenciais de citronela, eucalipto, capim-limão e canela a partir da concentração de 1% formavam halos de inibição, e no teste *in vivo* o óleo essencial de citronela apresentou um controle da doença de 81%.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de fitoalexinas e outros compostos de defesa (Schwan-Estrada, 2003)

As substâncias naturais obtidas de extratos vegetais e óleos essenciais, além de terem como vantagem o fato de não oferecer riscos à saúde humana e não promover a contaminação ambiental são promissoras no controle de doenças em várias culturas e, portanto, constituem-se em uma promissora alternativa ao uso de agrotóxicos. Diversos trabalhos relatam a eficiência de óleos essenciais na inibição *in vitro* de fitopatógenos e no controle de importantes doenças em plantas. Contudo, pesquisas aplicadas em campo ou em sistemas de produção ainda são limitadas.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade Paulista de Ciências Agrárias, Botucatu.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BARGUIL, B. M.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, R. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; SALGADO, S. M. L. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costaricensis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, set./out. 2005.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (Documentos, 15).

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, 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, mar./abr. 2004.

CAKMAK, I.; HORST, J. H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Conpenhagen, v. 83, n. 4, p. 463-468, Apr. 1991.

CALIFORNIA INDIAN BASKETWEAVERS ASSOCIATION. **A plant activator for disease protection**. Basel: CIBA Technical Data Sheet, 1995.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1, 3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p.1721-1730, dez. 2006

CHLAN, C. A.; BOURGEOIS, R. P. Class1chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): characterization, expression and purification. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 1, p. 143-154, June 2001.

CHUNG, R. P. T.; NEUMANN, G. M.; POLYA, G. M. Purification and characterization of basic proteins with in vitro antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. **Plant Science**, Limerick, v. 127, n. 1, p. 1-16, Aug. 1997.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by amino-butyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed.). *Modern fungicides and antifungal compounds*. **Andover: Intercept**, 1996. p. 461-466.

COMPANHIA INTEGRADA DE DESENVOLVIMENTO AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. Disponível em <<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2013/06/19/uso-indiscriminado-de-agrotoxicos-e-alvo-de-programa-do-ministerio-publico/>>. Acesso em 01/02/2014.

CORDEIRO, Z.J.M. & KIMATI, H. Doenças da Bananeira (*Musa spp.*) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia, volume 2: Doenças das plantas cultivadas**, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, cap. 13, p. 112-136, 1997.

COSTA, C.M.G.R., Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*; **Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v.2., n.2, p.11-14, jun. 2008

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p.185-209, Sept. 2004.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em <<http://www.cnph.embrapa.br/cultivares/>>. Acesso em: 26 fev. 2012.

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 of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 7/8, p. 483487, Aug. 2000.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.

Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.

GAUR, r.b.; SHARMAM, r.n. Biocontrol of root rot in cotton and compatibility of potential bioagents with fungicides. **Indian Journal of Plant Protection**, v.38, p.176-182, 2010.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 177-193, Apr. 2003.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A .; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores**: Saint Paul: APS Press, 1999. p. 37-53.

HERMAN, M.A.B.; DAVIDSON, J.K.; SMART, C.D. **Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes**. PHYTOPATHOLOGY, v.98, p.1226–1232, 2008

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <<http://www.ibge.net/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>> Acesso em: 30 jul. 2013

JONES, J. B.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; ALMIRA, E. C.; ROBERTS, P. D.; BOWEN, B. W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P. M.; CHUN, J. Systematic analysis of *Xanthomonas* (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 3, p. 1211-1219, May 2000.

JUNIOR, V.A.M. DOENÇAS BACTERIANAS EM TOMATEIRO: ETIOLOGIA E CONTROLE, 2005. Disponível em <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/doebacter.pdf>> Acessado em 07/10/2014.

KAGADE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Daturametel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, v. 1, p. 91-100, Jan./Feb. 2004.

KHAN, M. R.; ANWER, M. A. Fungal bioinoculants for plant disease management. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. Microbes and microbial technology. **New York: Springer**, 2011. p. 447-488.

KIMATI, H., AMORIM, L.FILHO, B.A, CAMARGO, A.E.L, REZENDE, M.A.J. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, vol.2, p. 652, 1997.

KARAMAN, Í.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethno pharmacology**, Lausanne, v. 85, n. 2/3, p. 231-235, Feb. 2003.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-59, Sept. 1994.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./june 2006.

LOUWS, E. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.

NASCIMENTO, A. R.; FERNANDES, P. M.; BORGES, L. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. 2013. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, 31: 15-24

OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the nonpathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 195-197, maio/jun. 1997.

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: Ceres, 1995. v. 1. cap. 22, p. 417-454.

PASQUA, R. D.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

PEIXOTO, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial do alumínio**. 1998. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PILOWSKY, M.; ZUTRA, D. Reaction of tomato genotypes to the bacterial speck pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 14, n. 1, p. 39-42, 1986.

ROMEIRO, R.S. 2008 Indução de resistência em plantas a patógenos In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Orgs), **Interação planta-patógeno: fisiologia e biologia molecular**. Piracicaba. Fealq, pp. 411-429.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L. V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 59-63, jan./fev. 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 1, p. 124-125, jan./mar. 2003.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. L.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 586-593, 2002.

SILVA, V.L.; LOPES, C.A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira** 20:179-183, 2005.

SILVA, E.O.; MARTINS, S.J.; ALVES, E. Essential oils for the control of bacterial speck in tomato crop. **African Journal of Agricultural Research**, 9(34), 2624-2629, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 467-495.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

STADNIK, M. J. **Induction of resistance in wheat by a benzothiadiazole derivative against the powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. tritici*): practical aspects and mechanisms of action**. 1999. 139 p. Dissertation (PhD Thesis) - University of Hohenheim, Stuttgart.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 23, p. 346, 1997. Suplemento.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDERMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, Aug. 1993.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, mar./abr. 1999.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 235-270, Jan./Dec. 1997.

STOCKINGER, E. J.; WALLING, L. L. Pto3 e Pto 4: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var. *glaberrimum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 879-994, 1994.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p.1-13, Jan./Mar. 2004.

UKNES, S. et al. Reduction of risk for growers: methods for the development of disease-resistant crops. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, n. 1, p. 3-10, May 1996.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. AH. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

VARVARO, L.; PIETRARELLI, G. B. L. Effects of Simulated rain on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato plants. **Journal of Plant Pathology**, v.88,p.245–251,2006.

VIGO-SCHULTZ, S. C. et al. Avaliação da eficácia da tintura 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, out/dez 2006.

YOUNG, J.M. et al. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, v.75, p.721-763, 1996.

ZADOKS, J. C. The cost in plant protection. **Journal of Plant Protection in the Tropics**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 1, p. 151-159, Jan./June 1992.

CAPÍTULO 2

Épocas de aplicação e concentração de óleos essenciais no controle da pinta bacteriana do tomateiro.

RESUMO

A pinta bacteriana tem como agente etiológico a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) e está entre as doenças mais importantes do tomateiro (*Lycopersicon lycopersicum*). Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo-da-índia (CR), canela (CA), citronela (CI), capim-limão (CL), eucalipto (EU), árvore-de-chá (ME), tomilho (TO), copaíba (CO) e erva cidreira (EC) no que diz respeito às épocas de aplicação e concentrações no controle da pinta bacteriana do tomateiro. Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação e um experimento *in vitro*. No ensaio *in vitro*, que teve como objetivo avaliar a ação direta dos tratamentos sobre *Pst*, os óleos essenciais foram utilizados nas dosagens de 0,1%, 1,0%, 10,0% e 100,0%. Foram utilizados também um padrão de cobre (Recop® 2,0 mg mL⁻¹), leite em pó (LP-1%) como emulsificante para os tratamentos à base de óleo. Sulfato de estreptomicina 25mg mL⁻¹ e água esterilizada foram utilizados como testemunhas. No primeiro experimento realizado em casa de vegetação, foram utilizados todos os óleos a 0,1%, acibenzolar-S-metil (ASM - 0,2 mg mL⁻¹) e Recop® 2,0 mg mL⁻¹, em duas épocas de aplicação. Como emulsificante para todos os tratamentos a base de óleo, foi utilizado leite em pó a 1,0% e, como controle, as testemunhas inoculada e absoluta. Foram aplicados os tratamentos em duas épocas diferentes: tratamentos aplicados antes da inoculação com a bactéria e tratamentos aplicados após a inoculação da bactéria. No segundo experimento em casa de vegetação, foi utilizada a melhor época de aplicação do primeiro experimento juntamente com os respectivos óleos essenciais mais promissores. Foram testadas ainda três concentrações (1.000, 1.500 e 2.000 µL L⁻¹) para estudar qual seria a melhor concentração que reduz o progresso da severidade da doença. Foi observado, no teste *in vitro*, que os óleos de canela, citronela, capim-limão e eucalipto, a partir de 1%, promoveram inibição do crescimento da *Pst*. A aplicação dos óleos essenciais somente uma vez antes da inoculação, proporcionou maior eficiência de controle. Os óleos essenciais de CI 2.000 µL L⁻¹ e CL 1.500 µL L⁻¹, e o ASM 0,2g L⁻¹ foram eficientes contra a pinta bacteriana do tomateiro, quando aplicados uma única vez sete dias antes da inoculação.

Palavras chave: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Controle Alternativo; *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

The bacterial speck has as etiologic agent the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) and it is among the most important diseases of tomato (*Lycopersicon lycopersicum*). This study was performed to evaluate the essential oils effect of clove (CR), cinnamon (CA), citronella (CI), lemongrass (CL), eucalyptus (EU), tea tree (ME), thyme (TO), copaiba (CO) and lemon balm (EC) with regard to application times and concentrations in the tomato bacterial speck control. Two experiments in the greenhouse and one in vitro experiment were performed. In the in vitro assay, which aimed to evaluate the direct action of the treatments on *Pst*, the essential oils were used in concentrations of 0.1%, 1.0%, 10.0% and 100.0%. We also used a copper pattern (Recop® 2.0 mg ml⁻¹), milk powder (LP-1%) as an emulsifier for oil-based treatments. Streptomycin sulfate 25 mg ml⁻¹ and sterile water were used as control samples. In the first experiment in a greenhouse, were used all 0.1% oils, acibenzolar-S-methyl (ASM - 0.2 mg mL⁻¹) and Recop® 2.0 mg mL⁻¹, in two application seasons. As an emulsifier for all oil-based treatments, milk powder was used at 1.0% and, as a control, inoculated and absolute control samples. The treatments were applied at two different times: treatments applied before inoculation with bacteria and treatments applied after the bacteria inoculation. In the second experiment in a greenhouse, we used the best application time of the first experiment along with its most promising essential oils. We also tested three concentrations (1,000, 1,500 and 2,000 uL L⁻¹) to study what would be the best concentration which reduces the disease severity progress. It was observed in the in vitro test, the cinnamon, citronella, lemongrass and eucalyptus oils, from 1%, promoted *Pst* growth inhibition. The application of essential oils only once before inoculation resulted in greater control efficiency. Essential oils of CI 2.000 µL L⁻¹, CL 1.500 µL L⁻¹ and the ASM 0,2g L⁻¹ were effective against the tomato bacterial speck when applied only once seven days before inoculation.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Alternative Control. *Solanum lycopersicum*.

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil, cerca de 3,36 milhões de toneladas por ano. A cultura destaca-se por apresentar amplo histórico de problemas fitossanitários que são responsáveis por perdas significativas na produção. Dentre as principais doenças da cultura, está a pinta bacteriana, que tem como agente etiológico a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Jones et al., 2000).

Toda a parte aérea da planta é suscetível à bactéria, que reduz o tamanho dos frutos, expondo-os à queimadura do sol devido à queda das folhas e depreciando-os por causa do aparecimento de manchas. A doença também causa queda prematura de flores e frutos (Lobo et al., 2005).

Para evitar perdas significativas na produção, os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. Este, por sua vez, pode ser realizado de maneira abusiva e indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (Franzener et al., 2007).

Neste contexto, buscam-se alternativas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (Zadoks, 1992). Os óleos essenciais de espécies vegetais têm em sua composição substâncias do metabolismo secundário, as quais podem exercer funções importantes na interação planta-patógeno. Esses óleos têm como vantagem o fato de não poluírem o ambiente e serem considerados uma alternativa no controle de fitopatógenos (Stangarlin et al., 1999), seja por sua ação fungitóxica (Bonaldo et al., 2004) ou bactericida (Vigo-Schultz et al., 2006).

Vários trabalhos mostram a atividade antimicrobiana desses óleos, por exemplo, num estudo recente, Silva et. al. (2014) ao avaliar o efeito dos óleos essenciais tomilho, eucalipto, árvore de chá, cravo-da-índia, canela, citronela e

capim-limão sobre Pst em tomateiro, observou que no teste *in vitro* a partir da concentração de 1% os óleos de EU, CI, CL e CA formam halos de inibição e no teste *in vivo*, plantas de tomateiro tratadas somente uma vez sete dias antes da inoculação com o óleo de CI, promove até 81% de redução da severidade da doença.

Diante dos resultados obtidos por Silva et al (2014), esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito desses óleos citados anteriormente acrescidos de mais dois (copaíba e erva-cidreira), as épocas de aplicação e as dosagens sobre o progresso da pinta bacteriana no tomateiro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Locais de Execução dos Experimentos

O Experimento 1, *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* foi realizado no laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras. O Experimento 2, avaliação do efeito de óleos essenciais no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação juntamente com o experimento 3, efeito das concentrações dos melhores óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação, foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Agricultura ambos realizados na UFLA.

2.2 Preparo das mudas de tomateiro

Em todos os experimentos foram utilizadas mudas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada suscetível a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. As mudas foram provenientes de semeadura em bandejas com 128 células, contendo como substrato uma mistura de 3 carrinhos de solo (50 litros), 100

gramas de super simples, 150 gramas de adubo 4:14:8 e um saco de substrato comercial Topstrato de 25 kg.

Quinze dias após a semeadura as mudas foram transplantadas para vasos de 3 kg que continham a mesma mistura utilizada anteriormente; em cada vaso foram transplantadas três mudas de tomateiro, estas por sua vez, foram mantidas em condições de casa de vegetação na UFLA, onde receberam os tratamentos culturais necessários para o pleno desenvolvimento da cultura até o final dos testes e avaliações.

2.3 Origem, isolamento, preservação e inoculação de *Pst*.

O isolado de *Pst* utilizado neste estudo pertence à coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. Esse isolado se encontra preservado em material herborizado e preservado em água mineral. Na realização dos ensaios, o isolado foi repicado para o meio 523 de Kado & Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas e incubado a 28°C, por 48h. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540nm} = 0,20$, correspondendo a aproximadamente a 10^8 ufc/mL (SILVA, 2008).

A inoculação foi realizada em plantas de tomate previamente expostas à câmara úmida por um período de 24 horas, via pulverização foliar até o ponto de escorrimento. Posteriormente foi realizada nova câmara úmida por mais um período de 24 horas para garantir a eficiência da inoculação (SILVA, 2008).

2.4 Composição dos óleos essenciais utilizados nos testes *in vitro* e *in vivo*.

Todos os óleos foram obtidos pela técnica de arraste a vapor e foram extraídos das folhas das plantas. Quanto ao composto majoritário dos óleos essenciais: eucalipto (*Corymbia citriodora*) é citronelal (78%); citronela (*Cymbopogon nardus*) é o citronelal (29,98%), citronelol (14,34%) e o geraniol

(18,2%); capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é o citral (76%); canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é o eugenol (94%); tomilho (*Thymus vulgaris*) é o timol (51,35%), p-cimeno(20%) é o carvacrol (4,4%); árvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia*) é o terpineol (terpinen-4-ol)- (43,5%) e cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) é o eugenol (73,7%) e o acetato de eugenila (11,2%).

2.5 Realização dos experimentos

2.5.1 Medida do halo de inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Este experimento foi realizado com óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), eucalipto (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson), tomilho (*Thymus vulgaris* L), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.), copaíba (*Copaifera officinalis*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry), erva-cidreira (*Lippia alba*) e árvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia* Cheel) na concentração de 0,1%, 1% e 10%, o padrão de cobre (Recop® 2,0 mg mL⁻¹e), leite em pó (LP-1%) como emulsificante para os tratamentos à base de óleo. Sulfato de estreptomicina 25mg mL⁻¹ e água esterilizada foram utilizados como testemunhas. Com o objetivo de examinar o potencial de inibição direta dos óleos essenciais sobre o desenvolvimento da bactéria, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados, com seis repetições. Discos de papel filtro autoclavados de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 20 µL de cada substância testada, secos à temperatura ambiente e colocados em placas de Petri com meio 523 de Kado & HesKett (1970) contendo 200 µL da suspensão de Pst na concentração de 5×10^8 UFC mL⁻¹ (A 540nm = 0,2), (SILVA, 2008). A presença e diâmetro de halos de inibição foram avaliados 48

horas depois da incubação em câmara de crescimento, ajustada para 28°C (Adaptado de Lucas et. al., 2012).

2.5.2 Avaliação do efeito de duas épocas de aplicação dos óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Neste experimento foram utilizados óleos essenciais de tomilho (TO), cravo-da-índia (CR), eucalipto (EU), canela (CA), citronela (CI), árvore de chá (ME), capim-limão (CL), copaíba (CO) e erva-cidreira (EC) na concentração de 0,1%. Para todos os tratamentos a base de óleo foi utilizado leite em pó (LP-1%) como emulsificante. Foram utilizados ainda, dois tratamentos adicionais, um como padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2mg.mL⁻¹ – Bion[®]) e outro como padrão de cobre (Recop[®] 2,0 mg mL⁻¹), além de testemunhas inoculada, absoluta e leite em pó.

Foram utilizadas duas épocas de tratamento: Plantas tratadas somente antes da inoculação (A) e plantas tratadas somente depois da inoculação (B). O tratamento A foi realizado aos 23 dias após a semeadura, enquanto que em B ocorreu somente aos 37 dias após a semeadura. Todas as plantas foram inoculadas aos 30 dias após a semeadura e as avaliações se iniciaram sete dias após. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC), com cinco repetições e parcela constituída de três plantas.

Foram realizadas cinco avaliações, para se determinar a severidade e a eficácia dos tratamentos. A intensidade da doença foi avaliada visualmente utilizando um índice de doença (ID) de 0-3 com: 0 = sem lesões, 1 = 2-5 manchas juntas ou espalhadas por toda a folha, 2 = 6-10 manchas, 3 = mais de 11 manchas por folha (Yunis et al., 1980).

Para a análise do controle os dados de severidade da doença foram transformados de acordo com o índice de McKinney (1923) para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner & Finney,

1977). A partir dos dados da AACPD, foi calculada a eficácia dos tratamentos pela fórmula: $EF = (Mtr - Mte) / (100 - Mte)$; onde: EF = eficácia do tratamento (%); Mtr = severidade do tratamento (%); Mte = severidade da testemunha (%) (Abbot 1925)

2.5.3 Efeito de concentrações dos melhores óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Este experimento foi realizado no intuito de avaliar em qual concentração os óleos essenciais mais promissores do experimento anterior tornam-se mais eficientes na redução do progresso da pinta bacteriana em casa de vegetação. Foram utilizados os óleos essenciais de citronela e capim-limão na melhor época de aplicação (antes da inoculação), obtidos no experimento anterior, o leite em pó como emulsificante a 1%, o tratamento padrão de indução de resistência (ASM 0,2 mg m L⁻¹), o padrão de cobre (Recop® 2,0 mg m L⁻¹) e uma testemunha inoculada. Foram utilizadas três concentrações dos óleos mais promissores: 2.000 µL L⁻¹, 1.500 µL L⁻¹, 1.000 µL L⁻¹. A metodologia de aplicação foi a mesma do experimento anterior. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC), três repetições e parcela constituída de três plantas. Foram realizadas cinco avaliações, para se determinar a severidade e a eficácia dos tratamentos. Foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento e a eficiência dos tratamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Medida do halo de inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Os óleos essenciais de TO, CO, EC, ME e CR, EU, CI e CA não foram tóxicos à *Pst* na concentração de 0,1%. Na concentração de 1%, os óleos essenciais de canela, citronela, capim-limão e eucalipto apresentaram halo de inibição, enquanto os óleos essenciais de tomilho, melaleuca, cravo da Índia, copaíba e erva-cidreira bem como o tratamento consistido por leite em pó, água e fungicida Recop® também não apresentaram inibição ao crescimento de colônias da referida bactéria. A partir da concentração de 10%, todos os óleos essenciais promoveram halos de inibição do crescimento da bactéria (Tabela 1).

Tabela 1: Inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* submetida a diferentes concentrações dos óleos essenciais: tomilho, copaíba, erva cidreira, cravo-da-índia, eucalipto, canela, citronela, árvore-de-chá, capim-limão; ao leite em pó e água estéril e aos padrões: Recop® e sulfato de estreptomicina.

Óleos essenciais	Concentrações em %			
	0,1	1,0	10	100
Citronela	-	+	+	+
Capim Limão	-	+	+	+
Eucalipto	-	+	+	+
Canela	-	+	+	+
Copaiba	-	-	+	+
Erva- cidreira	-	-	+	+
Tomilho	-	-	+	+
Árvore de chá	-	-	+	+
Cravo-da-índia	-	-	+	+
Leite em pó (1 mg/mL) ⁽³⁾	-	-	-	-
Oxícloreto de cobre (2 mg/mL) ⁽³⁾	-	-	-	-
Sulfato de estreptomicina (25 mg/mL) ⁽³⁾	-	-	-	+
Água Estéril ⁽³⁾	-	-	-	-

+ representa halo de inibição - ausência de halo de inibição.

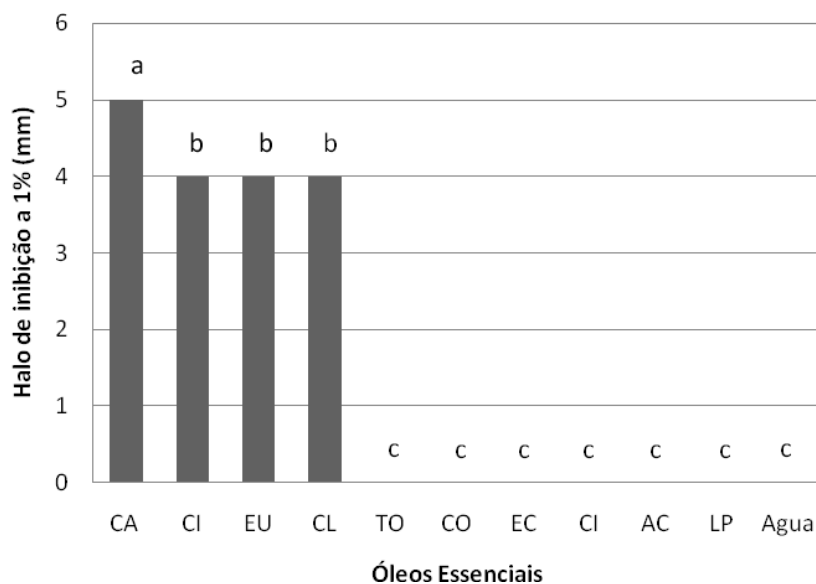


Figura 1 Medida do halo de Inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* submetida a concentração de 1% dos seguintes óleos essenciais: canela (CA), citronela (CI) eucalipto (EU), capim-limão (CL), tomilho (TO), copaíba (CO), erva-cidreira (EC), citronela (CI), árvore-de-chá (AC), Leite em Pó (LP) e Água. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Vem sendo comprovada por diversos autores, a atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias obtidas a partir de plantas medicinais. Vários resultados corroboram os obtidos no presente trabalho. Ponce et al. (2003) verificaram sobre o crescimento de bactérias, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo da Índia e do óleo de essencial árvore-de-chá.

Lucas et al. (2012) avaliaram o efeito de óleos essenciais na inibição *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria* e notou-se que a 1% o óleo essencial de tomilho, cravo da Índia e canela apresentaram halo de inibição ao desenvolvimento dessa bactéria. em o efeito dos óleos essenciais de tomilho, eucalipto, árvore de chá, cravo-da-Índia, canela, citronela e capim-limão sobre

Pst em tomateiro, observaram que no teste *in vitro* a partir da concentração de 1% os óleos de EU, CI, CL e CA formaram halos de inibição e a partir de 10% todos os óleos promovem inibição.

Martins et al (2009) estudando a atividade antibactericida dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* da bactéria *Ralstonia solanacearum* em tomateiro verificaram que tais óleos apresentaram eficácia quando utilizados puros sobre isolados de *R. solanacearum*. Já o óleo essencial de citronela foi efetivo contra a *R. solanacearum* nas concentrações de 8,0%, 4,0% e 2,0%, o óleo de alecrim nas concentrações de 8,0% e 4,0% e o óleo essencial de erva cidreira nas concentrações de 8,0%, 4,0%, 2,0% e 1,0%.

Outro composto natural com efeitos antifúngicos é o extrato de própolis. Quando aplicado na concentração de 10%, em testes *in vitro*, mostrou um potencial controle contra as bactérias fitopatogênicas *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (BIANCHINI; BEDENDO, 1998).

Amorim et al. (2011) com o objetivo de determinar a atividade de diferentes concentrações de óleos essenciais de citronela, eucalipto citriodora, cravo-da-índia e gengibre no crescimento de *R. solanacearum* e a incidência do moko em mudas de bananeira medindo-se o halo de inibição da bactéria, após 48 horas verificaram que os óleos de citronela, de cravo e de gengibre inibiram o crescimento de *R. solanacearum* em todas as concentrações testadas.

De acordo com os dados existentes na literatura, sabe-se que os óleos essenciais provenientes de plantas medicinais podem apresentar ação contra bactérias gram-negativas e gram positivas, e ainda sobre fungos filamentosos e leveduras (Prashar et. al., 2003). Porém poucos são os relatos do uso de óleos essenciais no controle de fitobactérias comparados com os trabalhos feitos com fungos.

3.2 Avaliação do efeito de duas épocas de aplicação dos óleos essenciais no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Foi observada uma interação significativa para a área abaixo da curva da severidade (AACPSD) da pinta bacteriana do tomateiro entre os produtos utilizados. Em nenhuma planta foi observado efeito de fitotoxidez, devido à aplicação dos tratamentos.

Nas plantas tratadas antes da inoculação com acibenzolar-S-metil (ASM), obteve-se um controle de 84% e CI, com controle de 72% foram os tratamentos mais eficientes para reduzir o progresso da pinta bacteriana do tomateiro, seguido pelos óleos de CL, TO, ME, CO, EC, EU, CA, com os respectivos controles de 51%, 50%, 47,6%, 47,2%, 31%, 27% e 26,3%, com controles respectivamente. O óleo essencial CR e o fungicida Recop® demonstraram baixa eficiência no controle da doença com 16% e 11%, respectivamente, igualando-se estatisticamente à testemunha tratada com água e leite em pó que não apresentou controle algum (Figura 2).

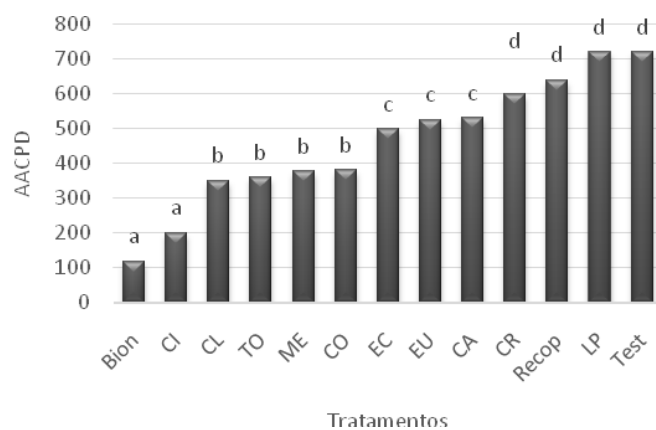


Figura 2

AACPD dos óleos essenciais em função dos tratamentos, testemunha a base de água (Test), leite em pó (LP), Recop®, copaíba (CO), erva cidreira (EC), cravo da índia (CR), canela (CA), eucalipto (EU), arvore de chá (ME), tomilho (TO), capim limão (CL), citronela (CI) e Bion® (ASM). Aplicação somente antes da inoculação (A). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

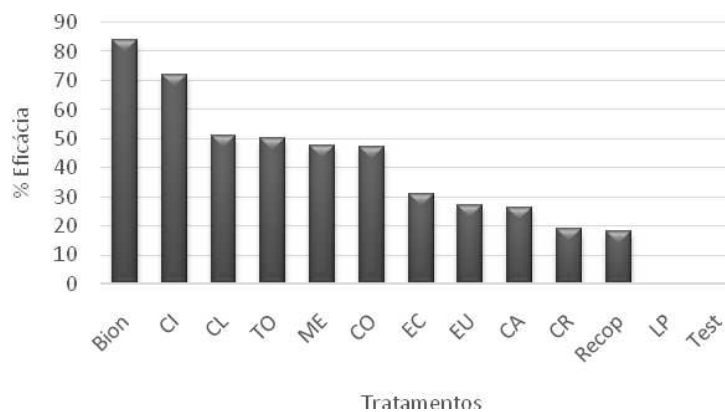


Figura 3

Eficácia dos óleos essenciais sobre o progresso da mancha bacteriana do tomateiro com o tratamento feito antes da inoculação da bactéria: testemunha a base de água (TEST), leite em pó (LP), Recop®, copaíba (CO), erva cidreira (EC), cravo da índia (CR), canela (CA), eucalipto (EU), arvore de chá (ME), tomilho (TO), capim limão (CL), citronela (CI) e Bion® (ASM).

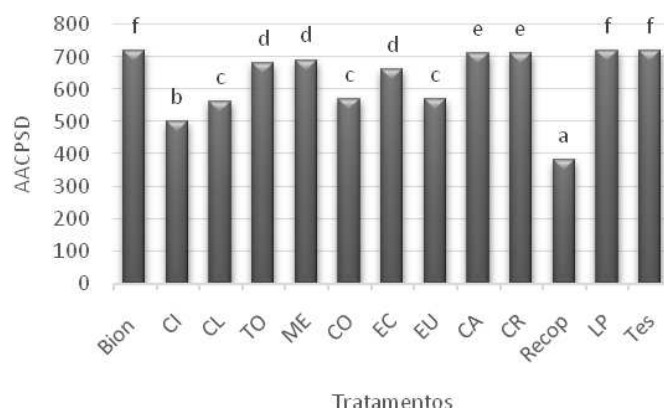


Figura 4 AACPD dos óleos essenciais em função dos tratamentos, testemunha a base de água (Test), leite em pó (LP), Recop®, copaíba (CO), erva cidreira (EC), cravo da índia (CR), canela (CA), eucalipto (EU), arvore de chá (ME), tomilho (TO), capim limão (CL), citronela (CI) e Bion® (ASM). Aplicação somente depois da inoculação (B). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

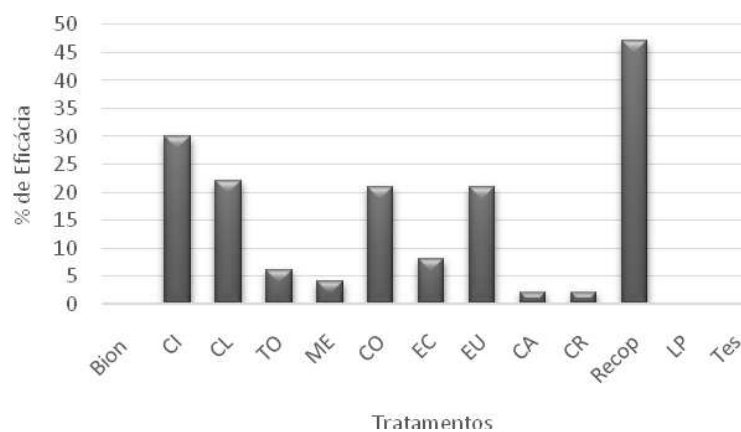


Figura 5 Eficácia dos óleos essenciais sobre o progresso da mancha bacteriana do tomateiro com o tratamento feito depois da inoculação da bactéria: testemunha a base de água (Test), leite em pó (LP), Recop®, copaíba (CO), erva cidreira (EC), cravo da índia (CR), canela (CA), eucalipto (EU), arvore de chá (ME), tomilho (TO), capim limão (CL), citronela (CI) e Bion (ASM).

Os resultados do presente trabalho demonstram que os óleos essenciais de plantas medicinais estudados possuem características muito mais próximas a produtos com ação indutora do que curativa, visto que houve melhores resultados quando os tratamentos foram aplicados antes da inoculação da bactéria. Apenas o óleo essencial de citronela, dentre os óleos estudados, apresentou características similares as do indutor padrão utilizado para o tomateiro (ASM). Isso porque, quando foi aplicado no tomateiro antes da inoculação com Pst reduziu a severidade da doença em 72% e segundo (SILVA et al. 2014) quando aplicado somente após a inoculação do patógeno, não há redução significativa da severidade da doença, semelhante ao observado com o ASM.

A eficiência de controle dos óleos utilizados neste trabalho é reforçada pelos resultados relatados por alguns autores em outros patossistemas. Perina (2008) observou redução de 68,7% na severidade de oídio da soja com a utilização do óleo essencial de capim-limão. Nas mesmas condições de tratamento, observou-se, no presente trabalho, redução de 63% na severidade da mancha bacteriana pequena.

Lucas et al. (2012) observaram que plantas tratadas somente antes da inoculação foram mais eficientes que plantas tratadas somente uma vez após inoculação. Observou-se também que em plantas tratadas antes da inoculação o ASM também foi o melhor tratamento com controle de 89% seguido de ME, CL, CR, CI, CA e TO com controles de 60%, 57%, 53%, 51%, 49% e 44%, respectivamente.

Silva et al. (2014) também observaram que plantas pré-tratadas com os óleos apresentaram uma menor severidade da pinta bacteriana no tomateiro em relação àquelas pós-tratadas sendo os melhores tratamentos o acibenzolar-S-metil e o óleo essencial de CI (91% e 83%, respectivamente). Em relação ao

pós-tratamento, o fungicida e os óleos de CL, EU, CI, TO e ME reduziram a doença em 40% - 8%, em relação ao tratamento controle (água).

Amorim et al. (2011) verificaram que mudas de bananeiras pulverizadas com os óleos de citronela e cravo-da-índia e após oito dias tendo sido inoculadas com *R. solanacearum*, houve um controle de 100% da doença quando comparadas aos óleos que foram aplicados após a inoculação da bactéria.

Silva (2012) realizando um teste em casa de vegetação observou que o óleo essencial de eucalipto reduziu significativamente a severidade de podridão mole (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) em alface crespa. Costa et al.(2008) constataram que o óleo puro de citronela (*Cymbopogon winteri anus*) foi mais efetivo do que o antibiótico tetraciclina na inibição do crescimento de seis isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Também Jeong et al. (2009) observaram atividade inibitória do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre três isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, com completa inibição do crescimento após 48h de incubação.

Os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial dos óleos essenciais de plantas medicinais no manejo de doenças de plantas, causadas também por bactérias, ressaltando a importância da pesquisa no patossistema estudado.

3.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação

Quando foram utilizados os óleos essenciais de citronela e capim-limão somente uma vez antes da inoculação, observou-se que os melhores tratamentos e dosagens foram: citronela 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, capim-limão 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$ seguidos

dos óleos essenciais de citronela 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$, capim-limão 1.000 e 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$. Os demais tratamentos promoveram eficiência intermediária (Figura 6).

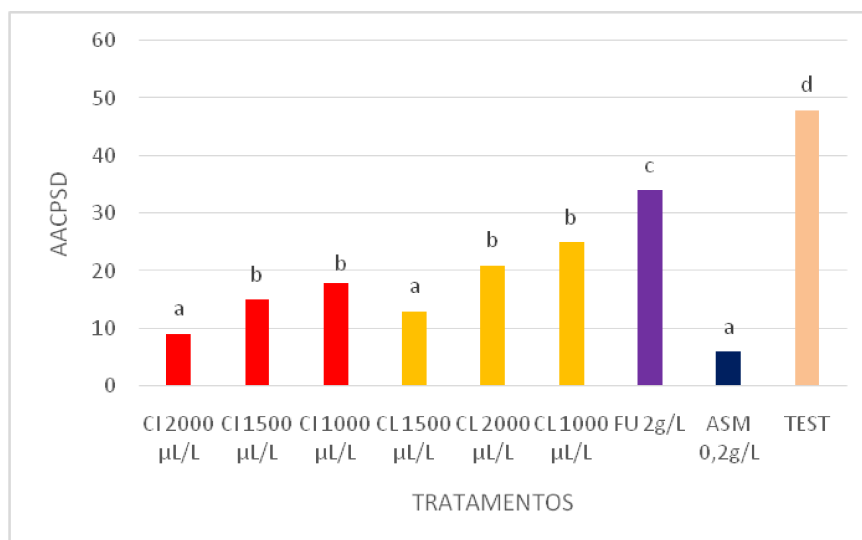


Figura 6 Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro dos óleos essenciais de citronela (CI) e capim-limão (CL) nas concentrações de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$; acibenzolar-S-metil (ASM) e Recop® (FU), quando pulverizados somente uma vez antes da inoculação com Pst. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A dosagem do óleo essencial de citronela que promoveu maior proteção contra Pst foi 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$, seguida de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ com 73%, 56% e 47%, respectivamente (Figura 2AB). Para o óleo essencial de capim-limão, a melhor dosagem foi 1.500 $\mu\text{L L}^{-1}$ (61%) seguida de 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (47%) e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (38%) que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 2AB). O melhor tratamento foi o ASM 0,2g L^{-1} , seguidos do óleo essencial de Citronela a $\mu\text{L L}^{-1}$, enquanto o pior tratamento foi o Capim Limão a 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$. O fungicida apresentou eficiência intermediária.

As plantas de tomateiro do experimento não apresentaram sinal de fitotoxidez devido a aplicação dos óleos essenciais em nenhuma concentração. Ao contrário, Medice et al. (2007) observaram sinais de fitotoxidez em plantas de soja tratadas com óleos essenciais de citronela e tomilho utilizados a 1,0%. Estas doses foram posteriormente reduzidas para 0,5% e 0,3%, respectivamente e o problema não foi mais observado. Os autores constataram que os óleos essenciais foram igualmente eficientes na redução da severidade causada por *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja. Perina (2008), trabalhando com os óleos essenciais de citronela e capim-limão nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,05%, constatou que plantas tratadas com a concentração mais baixa dos dois óleos essenciais tinham eficiência de controle inferior às concentrações mais altas em plantas de soja com oídio, fato esse não observado no presente trabalho.

Lucas et al. (2012) observaram em seu trabalho que os óleos essenciais de citronela 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$, capim limão 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ e árvore de chá 1000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ foram eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro quando aplicados somente sete dias antes da inoculação.

São poucos os trabalhos que utilizam diferentes doses de óleos essenciais em experimentos *in vivo*. Normalmente, a dosagem é pré-estabelecida de acordo com a literatura ou de acordo com testes *in vitro*, porém, na literatura são encontradas concentrações diversas e os testes *in vitro* nem sempre são representativos, pois os patógenos se comportam de forma diferente quando estão interagindo com as plantas e expostos às variáveis ambientais. Dessa forma, fica clara a necessidade de se determinar a concentração ideal para a utilização dos óleos essenciais, pois eles podem ser mais eficientes e mais viáveis economicamente.

No presente trabalho, foram apresentados resultados promissores na elucidação do modo de ação dos óleos essenciais de plantas medicinais. O teste *in vitro* mostrou que a 0,1%, os óleos essenciais não promovem inibição do

crescimento bacteriano, porém quando utilizados *in vivo*, no experimento em casa de vegetação, promovem redução da severidade da doença. Fica claro que as interações entre patógeno, hospedeiro e meio ambiente interferiram na atuação destes óleos essenciais.

4. CONCLUSÕES

1. A partir da concentração 1,0% os óleos essenciais canela, citronela, capim-limão e eucalipto promovem inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e, a 10%, todos os óleos essenciais estudados apresentaram este efeito.
2. Em relação à interação entre épocas de aplicação e controle da doença, foi observado que óleos essenciais aplicados somente uma vez antes da inoculação apresentam maior eficiência de controle do que aplicados depois da inoculação com a bactéria.
3. Os óleos essenciais de citronela 2.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ e capim-limão 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ bem como o ASM, são eficientes contra a pinta bacteriana do tomateiro quando aplicados uma única vez, sete dias antes da inoculação.

REFERÊNCIAS

- ABBOT, W.S. A method of computing the effectiveness of on insecticide. **Journal Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.
- AMORIM, E.P.R; Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira; **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 392-398, Outubro 2011
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P.. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, v.55, p.149-152, 1998.
- BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, 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, mar./abr. 2004
- COSTA, C. M. G. R. et al. 2008. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa 2: 11-14, 2008.
- FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: ciências agrarias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.
- JEONG, M. R. et al. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. **Mycobiology** 37: 48-52, 2009
- JONES, J. B. et al. Systematic analysis of *xanthomonas* (*Xanthomonas spp.*) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 3, p. 1211-1219, May 2000.
- LOBO, V. L. da S.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, jul./ago. 2005.
- LUCAS, G. C. et al. Indian clove essential oil in the controlo f tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.94, n. 1, p. 45-51, jan. 2012.

MARTINS, E.S.C.S; SANTOS, M.S; BARROS, H.M.M; FARIAS, M.A.A
Atividade antibacteriana de óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira
no controle *in vitro* da bactéria *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.
Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v.3, n.3, p.29-34, set. 2009.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of
wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural
Research**, v.26, p.195-218, 1923

MEDICE, R., ALVES, E., ASSIS, R.T., JUNIOR, M.R.G. & LOPES, E.A.G.L.
Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi*
Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.83-90, 2007.

PEREIRA, R. B. **Óleos essenciais no manejo da ferrugem e cercosporiose do
cafeeiro**. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal de Lavras, Lavras.

PERINA, F. J. **Avaliação de óleos essenciais e solução de leite no controle do
oídio da soja (*Microspheera diffusa*)**. 2008. 32p. Monografia (Graduação em
Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; VALLE, C.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of
essential oils on the native microflora of organic Swisschard. **Lebensmittel
Wissens chaft und Technologie**, London, v. 36, n. 7, p. 679-684, Nov. 2003

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression
of slow-mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**,
v.67, p.1051-1056, 1977.

SILVA, C.L. et al. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão
mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira** 30: 632-638, 2012.

YUNIS, H.; BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Two sources of resistance to
bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. **Plant Disease**, v.64,
p.851–852, 1980.

CAPÍTULO 3

Óleos essenciais de citronela e capim-limão e acibenzolar-S-metil na indução de resistência da pinta bacteriana do tomateiro.

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial dos óleos essenciais de citronela, do óleo essencial de capim-limão e do acibenzolar-S-metil na redução da pinta bacteriana do tomateiro e na ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa da planta. Foi realizado um teste *in vitro* para verificar a ausência ou presença de halo de inibição quando a célula da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) fica diretamente exposta a esses óleos. Ainda foi feito um experimento *in vivo* em casa de vegetação para verificar e há ou não redução no progresso da severidade da doença. Nesse experimento *in vivo*, mudas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$), óleo essencial de citronela (0,1%) e com óleo essencial de capim-limão e, sete dias depois, submetidas à inoculação (via pulverização foliar) de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Acibenzolar-S-metil apresentou controle de 83% enquanto os óleos essenciais de citronela e capim-limão apresentaram um controle de 72% e 61% respectivamente. Foi feito ainda uma análise de lignina e fenol total nas plantas tratadas com os óleos antes da inoculação com a bactéria e comparadas à testemunha sem inoculação e com o padrão de indução de resistência (ASM). A resistência induzida em planta pelos indutores acibenzolar-S-metil e dos óleos essenciais foi evidenciada pelo aumento do teor de lignina e fenol total aos 12 dias após as pulverizações. O acibenzolar-S-metil e os óleos essenciais de citronela e capim limão são potenciais indutores de resistência para o manejo da pinta bacteriana em tomateiro.

Palavras chave: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Controle Alternativo. Indução de Resistência.

ABSTRACT

This study was performed to evaluate the essential oils potential of citronella, lemongrass and acibenzolar-S-methyl in the tomato bacterial speck reduction and activation of some plant defense biochemical responses. An *in vitro* test was performed to verify the presence or absence of inhibition zone when the cell of the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) is directly exposed to these oils. Also it was made an *in vivo* experiment in a greenhouse to check if there is or not reduction in the disease severity progress. In this *in vivo* experiment, cv tomato seedlings Santa Cruz Kada were sprayed with acibenzolar-S-methyl (0.2 mg mL⁻¹), citronella and lemongrass essential oils(0.1%) and, seven days later, inoculated (via foliar spray) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Acibenzolar-S-methyl presented 83% of control while the citronella and lemongrass essential oils presented 72% and 61% respectively. It was also made a complete analysis of lignin and total phenol in the plants treated with oil before inoculation with bacteria and compared to the control sample without inoculation and with the pattern of resistance induction (ASM). The resistance induced in plants by acibenzolar-S-methyl inductors and essential oils was evidenced by an increase in lignin content and total phenol 12 days after spraying. Acibenzolar-S-methyl and the essential oils of citronella and lemongrass are potential resistance inducers for the tomato bacterial speck management.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. Alternative Control. Resistance Induction.

1 INTRODUÇÃO

A pinta bacteriana tem como agente etiológico bactérias do gênero *Pseudomonas* é uma das doenças que causam prejuízo ao tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em todo o mundo. Essa doença ocorre, preferencialmente, em ambiente quente e úmido e limita a produtividade de lavouras comerciais de tomateiro no Brasil.

Estratégias de controle para a pinta bacteriana são baseadas em uma combinação de práticas, tais como uso de sementes ou mudas livres do patógeno, eliminação de hospedeiros alternativos, adoção de cultivares resistentes, controle químico (Obradovic et al., 2004) e ativação das defesas naturais da planta.

A ativação das defesas naturais da planta por meio da resistência sistêmica adquirida (RSA) tem se destacado como uma das estratégias para o controle da pinta bacteriana em que moléculas eliciadoras ativam a resistência sistêmica na planta, a qual protege os tecidos contra o ataque subsequente de uma ampla gama de patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RSA é expressa, tanto local quanto sistemicamente, em resposta a patógenos que causam lesões necróticas (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioico (ASM) e o ácido 2,6- dicloroisonicotínico (INA). A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs). Estas possuem atividade antimicrobiana, são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammer Schmidt & Smith-Becker, 1999) e são mediadas por um processo dependente do ácido salicílico

Outros processos de defesa podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento da parede celular (Durrant & Dong, 2004). Vários produtos químicos e naturais vêm sendo descobertos e parecem atuar em diferentes pontos nas vias de ativação de defesa de plantas, imitando parte ou toda a ativação biológica de resistência. O acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência mais estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes Bion®, ACTIGARD™ e BOOST® (Venâncio et al., 2000). A cultura do tomateiro concentra a maior parte dos estudos com ASM. Silva et al. (2001a) verificaram redução na incidência de *Ralstonia solanacearum*, após duas pulverizações foliares (2,5 g i.a./100 L) e em torno de 50% a 60% na severidade da mancha bacteriana em relação à testemunha, após três pulverizações do produto (Silva et al., 2001b, 2003). Outros produtos alternativos, ainda pouco estudados, a serem utilizados na agricultura orgânica em substituição ao ASM são os óleos essenciais de citronela e capim-limão. Ponce et al. (2003) verificaram atividade antimicrobiana desse óleo sobre o crescimento de bactérias, na concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ pelo método mínimo de concentração. Sabe-se que os óleos de plantas medicinais são alternativas para o controle de fitopatógenos com a vantagem de não poluírem o ambiente (Stangarlin et al., 1999) e induzirem respostas de defesa na planta, por meio de fitoalexinas, peroxidases e proteínas relacionadas à patogênese (Schwan-Estrada, 2002; Kagade et al., 2004), o que indica a presença de compostos com característica de eliciadores. Diante dos desafios enfrentados pelos produtores, torna-se necessário o estudo de novas alternativas para o manejo integrado de doenças, mediante a utilização de produtos menos agressivos ao meio ambiente, bem como do modo como esses produtos agem na planta.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, verificar o efeito dos óleos essenciais de citronela, capim-limão e do acibenzolar-S-metil no

controle da pinta bacteriana do tomateiro e caracterizar as reações bioquímicas desenvolvidas em função do estímulo de indução no patossistema tomateiro versus *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (para o teste *in vitro*) de Bacteriologia de Plantas (repicagem e preservação da bactéria) e no laboratório da Fisiologia do Parasitismo (para as análises bioquímicas). Os experimentos *in vivo* foram feitos em casa de vegetação, no Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, a 960 m de altitude, nas coordenadas 44,97° de longitude oeste e 21,22° de latitude sul. O período de experimento foi de janeiro a dezembro de 2014.

2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram adquiridos da empresa Ferquima.

2.2 Origem, isolamento, preservação e Inoculação de *Pst*

O isolado de *Pst* utilizado neste estudo pertenceu à coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade de Viçosa. Esse isolado encontra-se preservado em material herborizado e em água mineral. Na realização dos ensaios, o isolado foi repicado para o meio 523 de Kado & Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas e incubado a 28°C, por 48h. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para A 540 nm = 0,20, correspondendo a aproximadamente, 5×10^8 ufc/ml (Silva, 2008).

A inoculação foi realizada em plantas de tomate previamente expostas à câmara úmida por um período de 24 horas, via pulverização foliar até o ponto de escorrimento e posteriormente foi realizada nova câmara úmida por mais um período de 24 horas para garantir a eficiência da inoculação (Silva, 2008).

2.3 Realização dos experimentos

Para examinar o potencial dos óleos essenciais de citronela e capim-limão em inibir o crescimento *in vitro* de *Pst*, foram utilizadas as concentrações de 0,1%, 1,0%, 10,0% e 100,0% e acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2 mg mL⁻¹ (padrão de indução de resistência), leite em pó 1,0% como emulsificante para o tratamento à base de óleo, sulfato de estreptomicina 25mg mL⁻¹ e água esterilizada, como testemunhas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Discos de papel de filtro autoclavados de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 20 µL de cada substância testada, secos à temperatura ambiente e colocados em placas de Petri contendo meio 523 de Kado & HesKett (1970) e 100 µL da suspensão de *Pst*. A presença e o diâmetro dos halos de inibição foram avaliados 48 horas depois da incubação, em câmara de crescimento ajustada para 28°C. Com o objetivo de avaliar o efeito desses dois óleos no controle da pinta bacteriana do tomateiro em casa de vegetação, utilizou-se a concentração de 0,1%, adicionada de leite em pó 1,0%. Dois tratamentos adicionais, acibenzolar-S-metil 0,2 mg mL⁻¹, como padrão de indução de resistência e Recop® 2,0 mg mL⁻¹, como padrão de cobre, além das testemunhas inoculada, absoluta e leite em pó foram utilizados. Os tomateiros foram tratados aos 23 dias após a semeadura (DAS) e a inoculação ocorreu aos 30 DAS. As avaliações iniciaram-se sete dias depois. A inoculação foi realizada em plantas de tomate previamente expostas à câmara úmida por um período de 24 horas, via pulverização foliar, até o ponto de escorrimento e, posteriormente, foi realizada nova câmara úmida por mais um

período de 24 horas, para garantir a eficiência da inoculação. Os experimentos foram conduzidos em delineamento blocos casualizados, três repetições e parcela constituída de três plantas. Foram realizadas cinco avaliações da severidade da pinta bacteriana. Posteriormente, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento, conforme a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977), e a porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha. Para caracterizar os mecanismos bioquímicos de defesa do tomateiro à *Pst*, induzidos pelo estímulo do óleo essencial de cravo-da-índia, foi realizado outro experimento. Sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram semeadas em vasos de 3L contendo uma mistura de 3 carrinhos de solo (50 litros), 100 gramas de super simples, 150 gramas de adubo 4:14:8 e um saco de substrato comercial Topstrato de 25 kg.

Aos 15 dias de idade, as plantas foram tratadas com os óleos essenciais de citronela e capim-limão a 0,1% (com e sem inoculação), acibenzolar-S-metil (ASM - 0,2 mg mL⁻¹) (com e sem inoculação) e testemunha (com e sem inoculação). Foi utilizado delineamento blocos casualizados, três repetições e a unidade experimental foi composta por um vaso contendo três plantas. A inoculação com *Pst* ocorreu quatro dias após o tratamento e as coletas no décimo segundo dias após o tratamento. As folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para análises posteriores. Para o preparo do extrato proteico, o tecido foliar foi homogeneizado, por meio de almofariz e pistilo, em 3mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo EDTA 0,1 mM, durante 5 minutos, em banho de gelo. Após a filtração em pano de trama fina, a solução foi centrifugada a 13.000 x g, por 15 minutos e o sobrenadante recuperado. Todos os passos foram executados a 0- 4°C. A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustada para 100 µL do extrato enzimático,

conforme ensaio de Bradford (1976). O conteúdo de lignina foi determinado pelo ensaio com ácido tioglicólico (TGA) (Monties, 1989), em que 0,2 g de tecidos meristemáticos foram incubados em acetona (85%), por 48 horas e centrifugados, a 7.500 x g, por 15 minutos. O precipitado foi seco e incubado com 5mL de ácido tioglicólico em HCl 2 N 1:10 (v/v), durante quatro horas. As amostras foram centrifugadas a 7.500 x g, por 15 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos, nos quais receberam 200 µl de HCl 10 N. Após o banho de gelo por quatro horas e centrifugação a 7.500 x g por 30 minutos, o precipitado obtido foi homogeneizado em 5 mL de NaOH 0,5 N e a absorbância medida a 280 nm. A quantidade de derivados TGA (lignina ácido-solúvel) formada foi medida pela comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 mg éter 2-hidroxipropílico mL⁻¹) e os valores expressos em micrograma de lignina por miligrama de matéria fresca (µg mg⁻¹ MF). Já o conteúdo de fenol total foi determinado adicionando 150 µL de extrto metanólico acrescido de 150 µL de Folin-Ciocalteu 0,25N a 5 minutos na temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados mais 150 µL Na₂CO₃ 1M, homogeneizado a 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi acrescido mais 1 mL de água destilada deionizada, e posto a 1 hora à temperatura ambiente. Foi feita a leitura a 725 nm com base na curva de catecol, expresso em mg catecol 150 g⁻¹ de tecido seco. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

Os dados foram submetidos à análises de variância em software estatístico Statistical Analysis System (SAS, v. 8.0) (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE – SAS INSTITUTE, 2001) e as médias comparadas pelo teste de Scott-knott a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos *in vitro* de quatro concentrações dos óleos essenciais de citronela (CI) e capim-limão (CL), acibenzolar-S-metil (ASM) e do sulfato de estreptomicina sobre o crescimento radial de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* são apresentados na Figura 7. Observou-se que todos os tratamentos testados promoveram o aparecimento de halos de inibição, com exceção do CI a 0,1% e do ASM. Segundo Kessmann et al. (1994), compostos químicos ou biológicos, para serem considerados indutores de resistência, não devem possuir atividade inibitória direta sobre o microrganismo patogênico. Entretanto, há, atualmente, uma flexibilização desse conceito, e vários compostos considerados indutores de resistência apresentam também ação direta sobre patógenos.

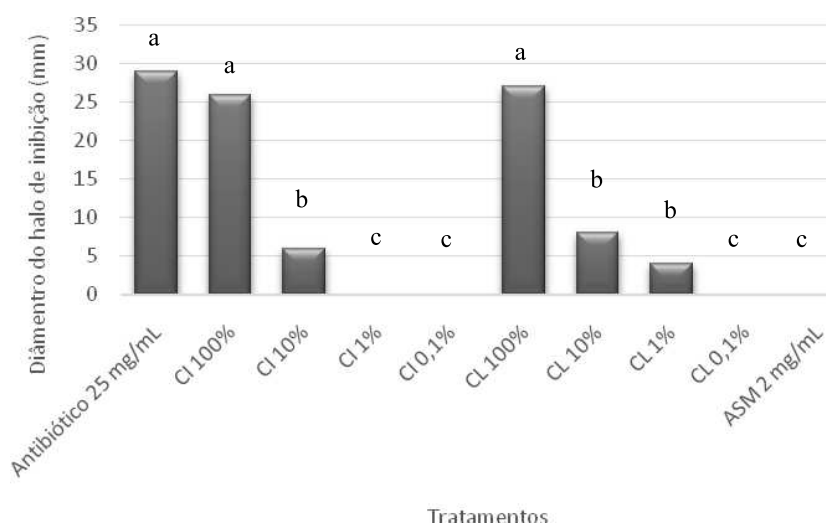


Figura 1 Inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* submetida a diferentes concentrações dos óleos essenciais de citronela (CI), capim-limão (CL), sulfato de estreptomicina (antibiótico) e acibenzolar-S- metil (ASM). Colunas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em condições de casa de vegetação, todos os tratamentos em comparação com a testemunha, teve uma porcentagem de controle da pinta bacteriana no tomateiro, o que reduziu no progresso da doença (Figura 8). O ASM foi o tratamento mais eficiente na redução da severidade da doença, com controle de 83% seguido de citronela e capim-limão, com controle de 72% e 61% respectivamente. O fungicida Recop®, utilizado como protetor na cultura do tomateiro, apresentou pouca eficiência em relação aos demais tratamentos, promovendo redução de apenas 19% na severidade da doença.

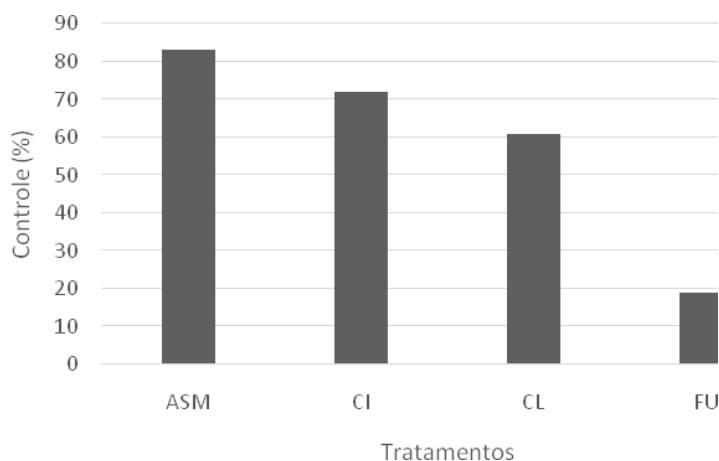


Figura 2 Controle da pinta bacteriana do tomateiro por meio da aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2 mg mL⁻¹, óleo essencial de citronela (CI) e capim-limão (CL) a 0,1% e Recop® (FU) 2,0 mg mL⁻¹, sete dias antes da inoculação.

Com relação à caracterização dos mecanismos bioquímicos de defesa avaliados, observou-se um aumento relativo do teor de lignina e do teor de fenol total (figura 9 e 10). Observou-se que a inoculação com *Pst* aumentou o teor de lignina e fenol total em folhas de tomateiro para todos os tratamentos, inclusive

na testemunha. Esse comportamento é um indicativo de que a inoculação, por si só, pode promover aumento na atividade das enzimas.

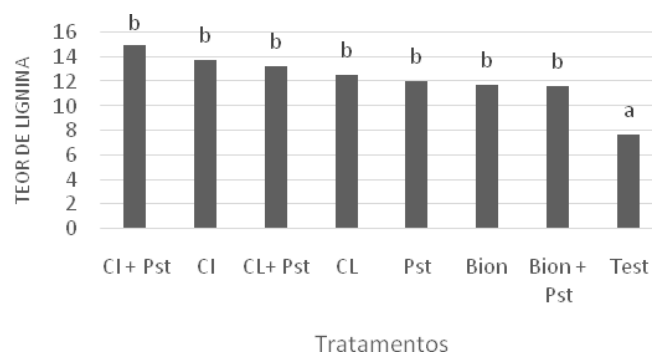


Figura 3 Teor de lignina solúvel ($\mu\text{g mg}^{-1}$ MS⁻¹) em folhas de mudas de tomateiro, aos 12 dias após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil, óleo essencial citronela (CI) e óleo essencial de campim-limão (CL) comparado com a testemunha (Test.). A inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) ocorreu 4 dias após pulverização. Colunas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

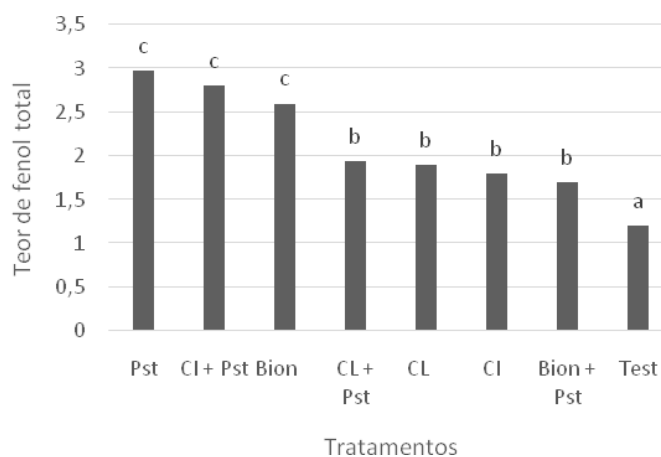


Figura 4 Teor de fenol total (mg catecol mg⁻¹ MS⁻¹) em folhas de mudas 12 dias após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S- metil , óleo essencial citronela (CI) e óleo essencial de capim-limão (CL) comparado com a testemunha (Test.). A inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) ocorreu 4 dias após pulverização. Colunas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Plantas tratadas e inoculadas apresentaram pequenos incrementos de lignina e fenol total em relação às não inoculadas. Tal fenômeno também foi observado por Pereira et al. (2008), em cafeeiro, o que, segundo os autores, pode ter ocorrido em razão do reconhecimento do patógeno ao hospedeiro. A lignificação da parede celular é caracterizada como uma das reações desencadeadas pelo sistema de defesa de planta, no sentido de impedir a penetração ou de restringir a colonização dos tecidos por patógenos (Resende et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo final obter, por meio do uso dos óleos essenciais de citronela e capim-limão, uma nova estratégia de manejo fitossanitário que possa ser repassada para os produtores rurais, tanto convencionais como aos da agricultura orgânica. Espera-se que esta estratégia

possa minimizar os custos financeiros e o prejuízo ambiental ocasionado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos.

4 CONCLUSÕES

1. Óleo essencial de citronela e capim-limão a 0,1% e o acibenzolar-S-metil (0,2mg mL⁻¹) não inibem o crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.
2. O óleo essencial de citronela, capim-limão e o acibenzolar-S-metil conferem capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.
3. O óleo essencial de citronela, capim-limão e acibenzolar-S-metil promovem lignificação da parede celular e também aumento no teor de fenol total na planta.
4. Dentre os óleos essenciais testados, o de citronela apresenta-se promissor no controle da pinta bacteriana em cultivos orgânicos de tomateiro.

REFERÊNCIAS

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, Sept. 2004.

KAGADE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Daturametel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, v. 1, p. 91-100, Jan./Feb. 2004.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, n. 1, p. 439-59, Jan./Dec. 1994.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; VALLE, C.; ROURA, S. I. Ant microbial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie**, London, v. 36, n. 7, p. 679-684, July 2003.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A. A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.). **Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS, 1999. p. 37-53.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 2, p. 177-193, Apr. 2003.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar application of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 736-740, July 2004

PEREIRA, R. B. **Óleos essenciais no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro**. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RESENDE, M. L. V. de; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F. R. Seleção de extratos vegetais para indução de

resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extratos e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 2002, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ESALQ/USP, 2002. p. 27-28.

SILVA, H. S. A.; DEUNER, C. C.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R.; BATISTA, U. G. Em suporte à estratégia de seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e para indução de resistência sistêmica e plantas com direcionamentos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, São Pedro. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001a.v. 26, p. 304.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G.; CARRER FILHO, R. Biocontrole experimental da mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*): antagonismo microbiano ou indução de resistência sistêmica? **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, p.106, 2001b. Suplemento

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V. de; SOUZA, R. M.; CAMPOS, J. R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, p. 244-248, 2003. Suplemento

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 16-21, jan. 1999.

VENÂNCIO, W. S. et al. Novos fungicidas II: famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 59-92, jun. 2000.