



**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA  
PINTA PRETA DO TOMATEIRO**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA PINTA PRETA DO  
TOMATEIRO**

Tese 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 Doutor.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

**LAVRAS- MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Lucas, Gilvaine Ciavareli.

Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro /  
Gilvaine Ciavareli Lucas. – Lavras : UFLA, 2012.  
92 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.  
Orientador: Eduardo Alves.  
Bibliografia.

1. *Alternaria solani*. 2. Controle alternativo. 3. Microscopia  
eletrônica. 4. Indução de resistência. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**  
**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA PINTA PRETA DO**  
**TOMATEIRO**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 8 de maio de 2012

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes	UFLA
Dr. Mario Sobral de Abreu	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfon	EPAMIG

Dr. Eduardo Alves  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2012**

Ao Ricardo, meu marido, por todos os momentos de companheirismo e pelo amor incondicional a mim dispensado.

Aos meus pais, Gilberto e Geni, que sempre me incentivaram nesta caminhada.

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pela orientação e amizade durante todos estes anos. Sua competência e confiança foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro na manutenção de equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA e financiamento do projeto.

Aos colegas do Laboratório e de Departamento, pela ajuda e amizade.

À professora Kátia Regina de Freitas Schwan-Estrada e ao professor Eduardo Seiti Gomide Mizubuti, pela total disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento da tese.

Aos meus pais, por todo o apoio pessoal, por se preocuparem com minha saúde e bem-estar e pela compreensão, dedicação, incentivo e convicção em meus objetivos.

Aos professores presentes na banca de defesa, pela gentileza em aceitarem o convite para participar da defesa da presente tese.

Ao Ricardo, por toda ajuda e carinho dispendidos a mim durante estes anos.

Sem vocês, nada disso seria possível!

## RESUMO

A pinta preta do tomateiro, que tem como agente etiológico fungos do gênero *Alternaria*, está entre as doenças mais importantes do tomateiro. A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. Óleos essenciais consistem em produtos promissores para o controle de doenças em plantas, pois não oferecem riscos à saúde humana e não agredem o meio ambiente. 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) e árvore-de-chá (ME) sobre a germinação de conídios e crescimento micelial de *Alternaria solani*; (ii) avaliar o efeito destes óleos e das épocas de sua aplicação no controle da pinta preta do tomateiro; (iii) avaliar, ultraestruturalmente, o efeito dos óleos por meio de microscopia eletrônica de varredura em plantas tratadas e inoculadas com o patógeno e (iv) avaliar o potencial do óleo essencial de capim-limão na redução da pinta preta do tomateiro e na ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa de plantas. Todos os óleos essenciais, exceto o de eucalipto, apresentaram efeito tóxico direto *in vitro*. Em casa de vegetação, todos os óleos essenciais promoveram redução parcial na severidade da pinta preta do tomateiro. Observações em microscópio eletrônico de varredura mostraram que os óleos essenciais são capazes de atrasar a germinação de conídios de *A. solani* e causar plasmolização das hifas, o que leva à redução do crescimento micelial do fungo. A expressão da indução de resistência induzida pelo óleo de capim-limão foi evidente por meio do aumento das atividades de peroxidases, polifenoloxidase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Não houve diferença significativa no teor de lignina e fenóis solúveis totais.

Palavras-chave: Controle alternativo. Microscopia eletrônica. Indução de resistência. *Alternaria solani*.

## ABSTRACT

Early blight of tomato, which is the etiologic agent fungi of the genus *Alternaria*, is among the most important diseases of tomato. The disease has high destructive potential, focusing on leaves, stems, petioles and fruits, causing high economic losses. Essential oils consist of promising products for controlling plant diseases, because they do not offer risks to human health and not attack the environment. Given the above, this work was carried out with the following objectives: (i) to evaluate *in vitro* the effect of essential oil of cinnamon (CN), Citronella (CI), lemongrass (LE), clove (CV), thyme (TH), eucalyptus (EU) and tea-tree (TT) on conidial germination and mycelial growth of *Alternaria solani*; (ii) evaluate the effect of these oils and times of their application in the control of early blight of tomato; (iii) evaluate the ultrastructurally effect of oils through scanning electron microscopy on treated plants and inoculated with the pathogen and (iv) evaluate the lemongrass essential oil potential on the reduction of early blight of tomato and the activation of some biochemical responses of plant defense. All essential oils except eucalyptus essential oil showed direct toxic effect *in vitro*. In the greenhouse, all essential oils promoted partial reduction in the severity of early blight of tomato. Observations by scanning electron microscopy showed that essential oils are able to delay the germination of *A. solani* spores and cause hyphal plasmolysis, which leads to reduction in mycelial growth. The expression of induced resistance induced by lemongrass oil was evident through the increased activity of peroxidases, polyphenol oxidase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases. No significant differences in lignin content and total soluble phenols.

Keywords: Alternative control. Electron microscopy. Induction of resistance. *Alternaria solani*.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1_ Introdução Geral</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Pinta preta do tomateiro</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Indução de resistência</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Óleos essenciais no controle de fitopatógenos</b> .....	18
<b>2.3.1</b>	<b>Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn)</b> .....	18
<b>2.3.2</b>	<b>Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)</b> .....	282,
<b>2.3.3</b>	<b>Citronela (<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle.)</b> .....	22
<b>2.3.4</b>	<b>Capim-limão (<i>Cymbopogum citratus</i> Staph)</b> .....	24
<b>2.3.5</b>	<b>Eucalipto citriodora (<i>Corymbia citriodora</i> (Hook.) K.D. Hill &amp; L.A.S. Johnson)</b> .....	25
<b>2.3.6</b>	<b>Árvore-de-chá (<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel)</b> .....	26
<b>2.3.7</b>	<b>Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L.)</b> .....	26
<b>2.4</b>	<b>A microscopia aplicada no estudo de fungos e sua interação com plantas</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>CAPÍTULO 2 Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro</b> .....	41
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

	<b>CAPÍTULO 3 Respostas de defesa induzidas pelo óleo essencial de capim-limão em tomateiro contra <i>Alternaria solani</i></b> .....	68
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	70
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	72
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	77
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## CAPÍTULO 1

### Introdução geral

### 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta originária da região andina. Inicialmente, foi domesticado no México, de onde se difundiu pelo mundo, por meio dos portugueses e espanhóis. Ao chegar à Europa, o fruto foi associado a outro da mesma família das solanáceas, a mandrágora, extremamente venenosa, motivo pelo qual foi rejeitado como alimento e aproveitado somente como ornamentação em jardins. Por volta de 1554, na Itália, ocorreu a primeira referência histórica da aceitação do tomate na alimentação humana. No Brasil, sua introdução ocorreu graças a imigrantes, no final do século XIX, porém, sua difusão e incremento ao consumo começaram a ocorrer apenas depois da Primeira Guerra Mundial, por volta de 1930 (ALVARENGA, 2004).

O tomate é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil, com cerca de 3,66 milhões de toneladas por ano. Seu mercado é caracterizado pelo giro da ordem de 1,5 bilhões de reais e o cultivo com 61,8 mil hectares, envolvendo diretamente mais de 200 mil pessoas na produção (GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS - GCEA, 2011).

Segundo o GCEA (2011), na safra de 2010/2011, os maiores destaques continuaram sendo os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, os quais, juntos, contribuíram com 60,0% da produção nacional e com 57,3% da área plantada.

A cultura do tomateiro destaca-se por apresentar um amplo histórico de problemas fitossanitários, responsáveis por perdas significativas na produção.

Dentre as principais doenças da cultura encontramos a pinta preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones e Grout (1896); a septoriose, causada por *Septoria lycopersici* Speg; a requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary; as murchas, causadas por *Verticilium* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen e *Ralstonia solanacearum*; o vírus do vira-cabeça do tomateiro; o cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*; a podridão mole, causada por *Erwinia* spp.; a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*; a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* e as galhas, causadas por *Meloidogyne* spp.

As doenças do tomateiro, de modo geral, são responsáveis por perdas significativas na produção. Para evitar esse problema, os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos, o que, por sua vez, pode ocorrer de maneira abusiva e indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007). As decisões dos produtores de adotar estas 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.

Neste contexto, surge a agricultura alternativa, que busca medidas de controle de doenças que minimizem o impacto negativo ao ambiente e ao homem (ZADOKS, 1992). Atualmente, têm-se, como medidas alternativas de controle de doenças, o controle biológico, o qual utiliza microrganismos antagonistas que têm 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, nelas existentes, em resposta a tratamentos com agentes bióticos e abióticos (BETTIOL, 1991), representados

por barreiras bioquímicas ou estruturais, que aumentam a resistência geral da planta (OLIVEIRA; PASCHOLAT; LEITE, 1997; UKNES et al., 1996).

As plantas medicinais têm, em sua composição, substâncias as quais 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 essenciais dessas plantas são considerados como alternativa no controle de fitopatógenos (STANGARLIN et al., 1999), seja com ação fungitóxica (BONALDO et al., 2004; FIORI et al., 2000) ou bactericida (KARAMAN et al., 2003; KUHN et al., 2006; VIGOSCHULTZ et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta, por meio de fitoalexinas, peroxidases e proteínas relacionadas à patogênese (KAGADE et al., 2004; LUCAS et al., 2012). 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 Pinta preta do tomateiro**

A pinta preta, também conhecida por mancha de alternaria, é uma das doenças foliares mais frequentes e importantes da cultura do tomateiro, no Brasil (VALE et al., 2000) e é causada por fungos do gênero *Alternaria*, entre eles *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, *Alternaria*

*tomatophila* Simmons e *Alternaria cretica* Simmons (RODRIGUES, 2009), ocorrendo praticamente em todas as regiões onde é cultivado.

As perdas provocadas por esta doença variam em função de inúmeros fatores, tais como época em que a doença se estabelece na cultura, taxa de progresso da doença, cultivar utilizada, assim como as condições ambientais prevaletentes (ALVARENGA, 2004).

A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. O aumento de suscetibilidade à pinta preta está, geralmente, associado a tecidos maduros, sendo mais frequente durante a fase de frutificação. A ocorrência de epidemias severas da doença está associada a temperaturas na faixa de 25 °C a 32 °C e elevada umidade, sendo caracterizada por intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, quebra de caules e depreciação de frutos.

O aspecto das lesões da pinta preta sempre lembra um alvo de tiro. Inicialmente, as lesões apresentam coloração de marrom-escuro a preta e aparecem em folhas mais velhas, podendo apresentar halo amarelado em volta delas. As lesões aumentam rapidamente em tamanho e em número. Com o crescimento, são formados anéis concêntricos em sua parte central. No caule, as lesões são escuras e ligeiramente deprimidas, sendo que, com o crescimento, formam-se lesões alongadas e circulares, com anéis concêntricos bem evidentes. Nos frutos, podem-se observar lesões deprimidas e de grande extensão, normalmente localizadas na região do cálice, de coloração escura, com aspecto aveludado e anéis concêntricos (MIZUBUTI; BROMMONSCHENKEL, 1996).

Atualmente, o pequeno número de cultivares com resistência genética à pinta preta, associado ao alto custo de suas sementes, determina medidas de controle, basicamente, com produtos químicos, para as variedades tradicionalmente cultivadas que são suscetíveis ao patógeno (VALE et al., 2000).

## 2.2 Indução de resistência

A indução de resistência é definida como um aumento da capacidade de defesa da planta contra um amplo espectro de organismos fitopatogênicos, incluindo fungos, bactérias e vírus (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A resistência resultante é proporcionada por um agente indutor que aciona mecanismos de defesa na planta, os quais se encontram na forma latente (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982). Essa ativação pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos: formas avirulentas de patógenos; raças incompatíveis; em determinadas circunstâncias, por formas virulentas de patógenos; extratos e óleos vegetais; extratos de fungos (LUCAS et al., 2012; STADNIK, 1999) ou por agentes abióticos (ativadores químicos), como o ácido aminobutírico (COHEN, 1996), o ácido 2,6-dicloroisonicotínico e o acibenzolar-S-metil (CIBA SPECIALITY CHEMICALS, 1995).

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (OLIVEIRA; PASCHOLATI; LEITE, 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). Sua duração pode ser de poucos dias a algumas semanas ou, mesmo, durar todo o ciclo de vida da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1995), passando, assim, a funcionar como um mecanismo de defesa constitutivo da planta. Os mecanismos de defesa envolvidos incluem a combinação de mudanças físicas, tais como a lignificação da parede celular, a formação de papilas ou a indução de várias proteínas relacionadas à patogênese (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Alguns autores dividem a RI em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) (STICHER; MAUCHMANI; METRAUX, 1997) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A ativação das defesas naturais da planta por meio da RSA é uma das estratégias de controle de doenças, pela qual 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 [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioico (acibenzolar-S-metil - 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, têm atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999). A produção de PRPs é mediada por um processo dependente do ácido salicílico. Outros processos de defesa podem ser incluídos, como a explosão oxidativa, o acúmulo de fitoalexinas, a lignificação e o enrijecimento de parede celular (DURRANT; DONG, 2004). Já na RSI, induzida por rizobactérias, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno (LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Dentre as PRPs, as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases despertam interesse pela interação plantas e fungos. As quitinases atuam hidrolisando a quitina, um polímero de  $\beta$ -1,4-N-acetil-glicosamina constituinte da parede celular de fungos (CHLAN; BOURGEOIS, 2001), e apresenta ação antibacteriana devido à sua ação lisozímica sobre a parede celular de fungos (STINTZI et al., 1993). As  $\beta$ -1,3-glucanases atuam hidrolisando  $\beta$ -glucanos, oligossacarídeos com ligações glicosídicas tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glicosil, também componentes da parede celular

de fungos (CHUNG; NEUMANN; POLYA, 1997). Outras PRPs muito estudadas são as peroxidases, cuja função principal é a proteção da célula a reações oxidativas. Sua atividade é frequentemente potencializada em resposta a estresses (CAKMAK; HORST, 1991). Outra função das peroxidases é a catalise da oxidação de alcoóis hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina, resultando na produção de radicais fenoxi-mesoméricos que reagem espontaneamente durante a deposição de lignina na parede celular, aumentando a resistência da planta à penetração (PEIXOTO, 1998).

O primeiro relato de indução de resistência em plantas foi descrito por Ray e Beauverie, em 1901, os quais obtiveram indução de resistência em begônia pelo uso de esporos atenuados de *Botrytis cinerea*. Os autores relacionaram a indução às condições ambientais de cultivo. Quase trinta anos mais tarde, Carbonne e Kalaljev confirmaram este 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 (BOSTOCK, 2005; STICHER; MAUCHMANI; METRAUX, 1997; 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 urediniósporos inativados de *Hemileia vastatrix* (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

Com o avanço nas pesquisas sobre extratos vegetais e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, constata-se a existência de uma grande quantidade de compostos secundários em plantas medicinais, tais como

alcaloides, terpenos, flavonoides e esteroides, entre outros (SILVA et al., 2005). Estas substâncias bioativas proporcionam a ativação do sistema de defesa em diferentes plantas contra patógenos, tais como *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro (PEREIRA et al., 2008; SANTOS et al., 2007), *Phoma* sp. (BARGUIL et al., 2005), *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro (CAVALCANTI et al., 2006; LUCAS et al., 2012), *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. et Fr.) em pepino e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em fumo (SCHNEIDER; ULLRICH, 1994), *Alternaria sesami* em gergelim (GULERIA; KUMAR, 2006), *Drechslera graminea* (Rabenh. ex Schldl.) em cevada (PAUL; SHARMA, 2002) e *Ralstonia solani* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) em arroz (KAGADE et al., 2004).

Lucas et al. (2012), ao tratar plantas de tomateiro com acibenzolar-S-metil (ASM) e óleo essencial de cravo-da-índia quatro dias antes da inoculação com *X. vesicatoria*, obtiveram redução da mancha bacteriana, em casa de vegetação. A resistência induzida em plantas tratadas com óleo de cravo-da-índia, segundo os autores, pode ser evidenciada pelos altos picos de atividades das enzimas relacionadas com a defesa, tais como peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases além de proporcionar maiores concentrações de lignina e de outros compostos fenólicos.

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais, 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 (BALBI-PEÑA et al., 2006; SCHWAN-ESTRADA, 2003).

### **2.3 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos**

Os óleos essenciais são substâncias geralmente obtidas de parte(s) 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 (PEREIRA et al., 2008, 2011; PINTO; SOUZA; OLIVEIRA, 2010), bactericida (LUCAS, 2009; VIGOSCHULTZ et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta (GULERIA; KUMAR, 2006; LUCAS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2009; 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; KAGADE et al., 2004; LUCAS et al., 2012; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003).

As substâncias naturais obtidas de extratos vegetais e óleos essenciais, além de ter 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 uma 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.

### **2.3.1 Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn)**

A canela pertence à família Lauraceae e é originária do Sri Lanka, no sul da Ásia. O óleo essencial de canela possui uma composição bastante variável e pode ser extraído tanto da casca como das folhas da árvore. O óleo apresenta de 60% a 90% de cinamaldeídos e 10% de eugenol, quando extraído da casca e 10% de cinamaldeídos e de 60% a 95% de eugenol, quando extraído das folhas (ALBUQUERQUE, 1989; SINGH et al., 2007). Estes componentes são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas (MONTES-BELMONT; CARVAJAL, 1998).

O óleo essencial de canela apresenta elevada toxidez a microrganismos, como comprovado por Pereira et al. (2008), por meio de teste de germinação e microscopia eletrônica de varredura de conídios de *Cercospora coffeicola* e *Hemileia vastatrix*. Souza et al. (2004) observaram redução do desenvolvimento micelial *in vitro* de *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* submetidos ao óleo de canela. Maqbool, Ali e Alderson (2010) observaram inibição significativa do crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, sete dias após o tratamento com o óleo, nas concentrações 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%. Os autores também observaram que a concentração de até 0,3% do óleo essencial pode atrasar a incidência da antracnose causada por *C. musae* e aumentar a vida de armazenamento de bananas para até 28 dias, sem afetar suas propriedades físico-químicas. A atividade bactericida do óleo foi evidenciada, por Lucas et al. (2012), sobre *Xanthomonas vesicatoria*.

O potencial do óleo essencial de canela no controle de doenças em casa de vegetação e em campo também foi relatado. Abreu (2006) observou redução de 26%, 62% e 95% na incidência da pinta preta em tomateiro, em plantas tratadas com o óleo essencial de canela, nas concentrações de 500; 750 e 5.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Em campo, o autor observou redução de 12,5% e 32,8% na incidência da doença, nas concentrações de 3.000 e 5.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Em

cafeeiro, o óleo essencial de canela controlou de forma significativa a ferrugem (PEREIRA et al., 2008) e a cercosporiose do cafeeiro (PEREIRA et al., 2011).

### 2.3.2 Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* L.)

O cravo-da-índia pertence à família Mirtaceae e é originária das Ilhas Molucas na Indonésia. De sua casca e frutos extrai-se o eugenol, principal componente de seu óleo essencial, seguido de  $\beta$ -cariofileno (SCHERER et al., 2009; SNOUSSI et al., 2008).

Analisando o poder antimicrobiano do óleo essencial de cravo-da-índia, Amorim et al. (2011) relataram que ele inibiu o crescimento de *Ralstonia solanacearum* em todas as concentrações testadas (1,25%; 3,5%; 3,7% e 5,0%). Ponce et al. (2003) constataram que a concentração de 0,04% foi suficiente para inibir o crescimento de bactérias pelo método mínimo de concentração. A inibição de *X. vesicatoria* também foi verificada por Lucas et al. (2012). Em fungos, Pereira (2008) verificou inibição total do crescimento micelial de *C. coffeicola* e a inibição da germinação de *C. coffeicola* e *H. vastatrix*. Utilizando o extrato de cravo-da-índia, Venturoso et al. (2011) verificaram inibição total do crescimento micelial dos patógenos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. Resultados semelhantes foram apresentados por Roswalka et al. (2008), segundo os quais o extrato inibiu completamente o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Amaral e Bara (2005), estudando o comportamento da essência do cravo-da-índia sobre crescimento fúngico em sementes de arroz, soja, milho e feijão, observaram que este óleo apresentou ação fungicida nas concentrações de 0,5% a 0,1%, agindo, possivelmente, na parede celular do patógeno, fato posteriormente confirmado por Lucas (2009), que observou, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, a degradação

da parede celular de *X. vesicatoria*, ocasionada pelo óleo. Beg e Ahmad (2002) observaram que o óleo essencial de cravo-da-índia, na concentração de 0,05% a 20,0%, tem atividade fungicida sobre *Alternaria alternata*. A concentração mínima fungistática encontrada foi de 0,05%. Acima desta concentração, foram detectadas lise de conídios e inibição do crescimento micelial.

Análises microscópicas mostraram lise de 20% a 40% dos conídios de *A. alternata*, após 72 horas de incubação na concentração de 5%. No entanto, o óleo, na concentração de 10%, promoveu até 20% de lise de conídios, em 24 horas de incubação. Sukatta et al. (2008) relataram a eficiência do óleo essencial de cravo-da-índia sobre seis fungos de pós-colheita de uva, *Aspergillus niger*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis viticola* e *Rhizopus stolonifer*. Atividade antifúngica do óleo de cravo contra todos os fungos acima mencionados mostraram concentração inibitória mínima (MIC) de 200, 200, 400, 800, 200 e 200 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A eficiência do óleo e do extrato de cravo-da-índia também foi evidenciada no controle de algumas doenças, como na antracnose em frutos de goiaba (*Psidium guajava* L.) (ROSWALKA et al., 2008), na ferrugem e na cercosporiose em cafeeiro (PEREIRA et al., 2008) e na mancha bacteriana em tomateiro (LUCAS et al., 2012).

### **2.3.3 Citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.)**

A citronela é uma planta aromática semelhante ao capim-limão e pertence à família Poaceae. Ela é conhecida por conter em suas folhas um óleo essencial com propriedades antimicrobianas e repelentes, tendo como constituintes majoritários b-citronelal, geraniol e  $\beta$ -citronelol (SCHERER et al., 2009).

A atividade antimicrobiana do óleo de citronela tem sido comprovada sobre diversos fitopatógenos, tais como *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zam. & Gilb (SANTOS et al., 2001), *R. solanacearum* (AMORIM et al., 2011), *C. coffeicola* e *H. vastatrix*. (PEREIRA et al., 2008), *X. vesicatoria* (LUCAS, 2009) e a bactéria *Erwinia carotovora* (COSTA et al., 2008). Alves et al. (2003) relataram a eficiência do óleo de citronela no controle dos fungos *C. gloeosporioides*, *Colletotrichum musae* Berk e Curt. e *F. subglutinans* f. sp. *ananas*. Rios et al. (2003) observaram que o óleo de citronela, nas concentrações de 5,0%, 10,0% e 15,0%, reduziu parcialmente o crescimento micelial de *C. acutatum*, agente da flor preta do morangueiro, enquanto, na concentração de 20,0%, ocorreu inibição total deste crescimento.

A eficiência do óleo de citronela também foi observada no controle de doenças. Em experimentos realizados em mudas de bananeira, verificou-se que o óleo essencial de citronela 1,25% promoveu redução de 50% na incidência do mal-do-panamá, causado por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (SILVA, 2007). Este óleo também foi eficiente no controle da ferrugem asiática da soja (MEDICE et al., 2007). Perini et al. (2011), utilizando o óleo essencial de citronela no controle de *Pyricularia grisea*, observaram que a aplicação do óleo na concentração de 2% promoveu ausência dos sintomas da doença em 50% das repetições, quando avaliado seu efeito na forma curativa e preventiva.

Por meio de observações realizadas em microscópio eletrônico, Billerbeck et al. (2001) e, posteriormente, Helal et al. (2007) observaram que a parede de hifas de *A. niger* e de *A. flavus*, respectivamente, desapareceram, em algumas regiões, após o tratamento com óleo essencial de citronela. Medice et al. (2007) e Pereira et al. (2011) verificaram que este inibiu totalmente a germinação de urediniosporos de *P. pachyrhizi* e de *C. coffeicola*. Lucas (2009) observou, em microscopia eletrônica de transmissão, que células de *X. vesicatoria* expostas ao óleo apresentaram degradação da parede celular e

alteração na densidade citoplasmática. Além de apresentarem atividade antimicrobiana, o extrato e o óleo essencial de citronela podem atuar como eliciadores na indução de fitoalexinas, como observado por Moreira et al. (2008), em plantas de sorgo.

#### **2.3.4 Capim-limão (*Cymbopogon citratus* Staph)**

O citral é o componente principal do óleo essencial de capim-limão, de 70% a 80%, sendo o responsável pelo odor de limão característico da planta (SIMÕES et al., 1999).

Onawunmi, Yisak e Ogunlana (1984), estudando a atividade antibacteriana dos constituintes do óleo essencial do *C. citratus*, constataram que ambos,  $\alpha$ -citral e  $\beta$ -citral, foram ativos contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, entretanto, *E. coli* foi mais resistente do que *S. aureus*, resultado também observado por Bertini et al. (2005).

A aplicação do óleo essencial de capim-limão como opção no controle fitossanitário vem sendo estudada em vários trabalhos. Wilson et al. (1997) verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* inibiu totalmente a germinação de esporos de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, até mesmo em baixas concentrações, 0,39% e 6,25%. Lemos et al. (1992) e Sridhar et al. (2003) observaram que o óleo de capim-limão apresentou controle de *C. lindemuthianum*, *A. alternata*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. Nguetack et al. (2004), avaliando o efeito do óleo essencial de capim-limão no crescimento micelial de fungos, observaram que o óleo promoveu redução de 64% no desenvolvimento de *Fusarium moniliforme* Sheldon, na concentração de 200 ppm; de *A. flavus*, em 48% e de *Aspergillus fumigatus* Fresenius, em 77%, na concentração de 500 ppm. O controle total ocorreu na concentração de 300 ppm para *F. moniliforme* e 1.200 ppm para *A. flavus* e *A. fumigatus*. Já

Rozwalka et al. (2008) e Wilson et al. (1997) verificaram a atividade fungitóxica do óleo essencial de capim-limão sobre a germinação de esporos de *B. cinerea* e sobre o desenvolvimento micelial de *Glomerella cingulata* e *C. gloeosporioides*. Shafique, Majeed e Shafique (2012) utilizaram solução aquosa e extratos metanólicos e o óleo essencial de *C. citratus*, e verificaram que o óleo essencial de capim-limão provou ser o mais eficaz, pois induziu inibição completa de *A. alternata* e *Alternaria tenuissima* em todas as concentrações avaliadas (1%, 2%, 3% e 4%).

### **2.3.5 Eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson)**

Em geral, os óleos essenciais de eucalipto são constituídos de terpenos mais complexos, como o citronelal e o cineol. Outros constituintes da essência estão presentes na proporção de 20% a 30%, como  $\alpha$ -pineno, piperitona, felandreno, butiraldeído e hexanal (CHARLES; SIMON, 1990).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto tem sido verificada por diversos autores. Trabalhando com diferentes espécies de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora*) na inibição micelial *in vitro* de *F. oxysporum*, *Botrytis sorokiniana* e *B. cinerea*, Salgado et al. (2003) concluíram que todas as espécies tiveram efeitos fungistáticos nas concentrações de 500 mg L<sup>-1</sup>, mas o *E. urophylla* obteve o melhor desempenho, que foi atribuído à presença do composto globulol. Dias-Arieira et al. (2010) observaram redução significativa do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, quando submetido ao óleo de *E. citriodora* nas concentrações de 0,25%, 0,5%, 1,0% e 1,5%. Carnelossi et al. (2009) avaliaram *in vitro* e *in vivo* o controle de *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose do mamão em pós-colheita, submetido ao óleo essencial de eucalipto a 1,0% e observaram que

frutos tratados e inoculados 24 horas após os tratamentos apresentaram redução da doença, confirmando o potencial do óleo. Bonaldo et al. (2004), utilizando extratos aquosos de eucalipto em pepino contra *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ells & Halst, agente causal da antracnose, verificaram que este, além de apresentar atividade antifúngica ao patógeno, conferiu indução de resistência local.

### **2.3.6 Árvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia* Cheel)**

A constituição química do óleo essencial de árvore-de-chá, ou melaleuca, é bem conhecida, sendo rico em terpinen-4-ol, principal responsável por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (VIEIRA et al., 2004).

Ponce et al. (2003), analisando o poder antimicrobiano do óleo essencial de árvore-de-chá, constataram que a concentração de 500 a 800  $\mu\text{L L}^{-1}$  foi suficiente para a inibição do crescimento de bactérias pelo método mínimo de concentração. Martins et al. (2010) avaliaram o efeito do óleo essencial de *M. alternifolia* (0,0%, 0,2%, 0,4%, 0,6% e 0,8%) na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *A. alternata*. O óleo essencial de melaleuca inibiu o desenvolvimento de todos os fungos avaliados.

Em trabalho realizado por Medice et al. (2007), utilizando óleo essencial de árvore-de-chá no controle da ferrugem asiática da soja, os autores verificaram redução significativa na severidade da doença, semelhante à conferida pelo fungicida padrão utilizado. Já Lucas (2009) demonstrou a eficiência do óleo e no controle da mancha bacteriana do tomateiro causada por *X. vesicatoria*.

### **2.3.7 Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**

O tomilho apresenta constituintes ativos reconhecidos cientificamente, como o timol e o carvacrol, os quais têm características similares às de bactericidas e fungicidas (PINTO et al., 2001).

Em experimento realizado *in vitro* por Zambonelli et al. (1996), utilizando o óleo essencial de tomilho a 800 ppm, observou-se redução do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* (Sacc & Magnus) e *Pythium ultimum* Trow. Os autores também constataram a degeneração e extravasamento do citoplasma celular de hifas, utilizando a microscopia eletrônica de varredura.

Alguns trabalhos realizados *in vivo* têm apresentado resultados promissores com a utilização do óleo essencial de tomilho no controle de doenças. Romero et al. (2009) avaliaram um óleo constituído por timol (50%), p-cimeno (20%),  $\gamma$ -terpineno (18%), carvacrol (4,5%) e borneol (1,5%) sobre *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Erwinia psidii*, *Sclerotinia minor* e *C. musae*. A concentração do óleo essencial de tomilho que promoveu completa inibição dos microrganismos avaliados variou de 5 a 200  $\mu\text{L/mL}$ , sendo mais eficaz para o controle de *C. musae* (5  $\mu\text{L/mL}$ ), *S. minor* (10  $\mu\text{L/mL}$ ), *F. moniliforme* (10  $\mu\text{L/mL}$ ) e *C. cassiicola* (15  $\mu\text{L/mL}$ ). Almada, Lima e Possamai (1998) observaram efeito fungitóxico do óleo essencial de tomilho em plantas de pepino inoculadas com *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostov em casa de vegetação. Medice et al. (2007) observaram redução de 34,6% a 62,3% na severidade da ferrugem da soja, em diferentes cultivares tratadas com o óleo de tomilho a 3.000 ppm. Os autores também relataram um efeito direto do óleo de tomilho sobre a formação de urédias e uredinósporos do fungo, o que também observado por Pereira et al. (2008) em plantas de café tratado com óleo de tomilho a 1.000 ppm e inoculadas com *C. coffeicola*.

Como verificado nos exemplos citados, é possível controlar fitopatógenos utilizando produtos naturais, os quais propiciam aos agricultores

uma agricultura sustentável e a baixo custo, não poluem o meio ambiente e resultam em alimentos saudáveis para a população.

#### **2.4 A microscopia aplicada no estudo de fungos e sua interação com plantas**

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou a resistência da hospedeira ocorre no âmbito da célula, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para se visualizar tais processos de infecção, o microscópio eletrônico de varredura (MEV) tem oferecido inestimáveis contribuições (ALVES; LEITE; KITAJIMA, 2008).

Em estudo realizado por Araújo e Matsuoka (2004), com a finalidade de esclarecer a natureza da resistência entre cultivares de tomateiro resistentes (*Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum*) cv. CNPH 417 e suscetível (*L. esculentum*) cv. Miller, à pinta preta (*Alternaria solani*), os autores observaram, por meio da MEV, que ambos os genótipos comportaram-se de maneira semelhante nos processos de pré-penetração, penetração e pós-penetração. Entretanto, nos processos de patogênese, na cultivar resistente, houve menor número de apressórios, de penetrações e de lesões. Assim, os autores concluíram que a resistência de *L. hirsutum* var. *glabratum* (CNPH 417) a *A. solani* é expressa na fase de pré-penetração, principalmente pelo baixo número de apressórios formados.

Trabalhos ultraestruturais utilizando a microscopia eletrônica de varredura e transmissão com fitopatógenos expostos a óleos essenciais são raros, porém, vem se verificando, ao longo dos anos, que os óleos essenciais têm a capacidade de controlar doenças em plantas, mas o mecanismo pelo qual eles

atuam ainda não é bem esclarecido. Medice et al. (2007), trabalhando com óleos essenciais no controle de *P. pachyrhizi*, observaram que o óleo essencial de tomilho atua sobre a germinação dos urediniósporos na folha, na formação de urédias e sobre a viabilidade dos urediniósporos, enquanto os óleos de eucalipto, citriodora e citronela atuam apenas sobre o tamanho das urédias. Com isso, os autores inferiram que os óleos essenciais apresentam potencial para reduzir o ataque de *P. pachyrhizi* em plantas de soja.

Pereira et al. (2011) testaram os óleos essenciais de capim-limão e citronela no controle de *Cercospora coffeicola* e observaram, através de MEV, que, em todas as cultivares utilizadas (Mundo Novo 379/19, Catuaí IAC 62 e Catuaí 2SL), a germinação dos conídios iniciou-se quatro horas após a inoculação, mas diferenças significativas só foram observadas a partir de oito horas após a inoculação. Nas folhas controle das três cultivares estudadas, os conídios apresentaram-se em estágio avançado de germinação com desenvolvimento micelial em sua superfície. Entretanto, nas folhas tratadas com os óleos, foi possível observar que poucos conídios haviam germinado e poucos tubos germinativos haviam sido emitidos. Em alguns conídios, foi possível observar o extravasamento celular, indicado pelo processo de plasmolização, revelando que, realmente, estes óleos podem ser utilizados no controle alternativo de *C. coffeicola*.

Neste contexto, Pereira et al. (2008) avaliaram o efeito de concentrações do óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil (ASM) sobre o patógeno através da microscopia eletrônica de varredura. Os autores puderam observar que os conídios de *C. coffeicola* iniciaram a germinação quatro horas após a inoculação em todos os tratamentos, com exceção do tratamento constituído de óleo essencial de tomilho, no qual a germinação foi pouco evidenciada. Nos tratamentos em que as plantas foram tratadas com extrato de casca de café, os conídios de *C. coffeicola* originaram tubos germinativos mais desenvolvidos e

em maior número, micélio mais desenvolvido e crescimento micelial superior aos demais tratamentos, 8, 16 e 48 horas após a inoculação, respectivamente. Os autores relataram que, neste caso, grande quantidade do extrato ainda encontrava-se aderida à superfície foliar. No entanto, nos tratamentos em que as plantas foram tratadas com OET, os conídios do fungo apresentaram baixa germinação, crescimento reduzido e extravasamento celular, sugerindo que este pode ser um produto promissor no controle alternativo da cercosporiose do cafeeiro. Os autores observaram também que o ASM não apresentou qualquer alteração na germinação e no desenvolvimento micelial de *C. coffeicola* na superfície de folhas de cafeeiro.

Trabalhos ultraestruturais utilizando a microscopia eletrônica de varredura com o patógeno *A. solani* em tomateiro, relacionados com os eventos de pré-penetração, penetração e colonização, são raros. Até o momento, não se tem conhecimento concreto do tipo de barreiras produzidas pela planta contra a ação do patógeno, se estas são bioquímicas (fitoalexinas, fenóis, quitinases e glucanases) ou físicas (lignina, papilas, gomas, ceras, etc.). Estes estudos são necessários para o esclarecimento das respostas de defesa, pré-formada e pós-formada pela planta para os patógenos em estudo. O mesmo acontece para o efeito de óleos essenciais. Tem se verificado o fato de os mesmos poderem controlar doenças, mas o mecanismo pelo qual os óleos essenciais atuam ainda não é esclarecido.

## REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ALBUQUERQUE, J. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS/MEC, 1989. 96 p.

ALMADA, C. B. J.; LIMA, C. Z. R. L. Z.; POSSAMAI, C. J. Controle alternativo do míldio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk & Curt) em pepino (*Cucumis sativus* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 294, ago. 1998. Suplemento.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400 p.

ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Org.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 433-466.

ALVES, E. S. S. B. et al. Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 343-343, ago. 2003. Suplemento.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 1, p. 5-8, 2005.

AMORIM, E. P. R. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 392-398, out. 2011. Volume especial.

ARAÚJO, J. C. A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da Interação *Alternaria solani* e tomates resistentes e suscetíveis. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 268-275, maio/jun. 2004.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: I., avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, maio/jun. 2006.

- BARGUIL, B. M. et al. 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.
- BEG, A. Z.; AHMAD, I. In vitro fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 317-319, Aug. 2002.
- BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.
- BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (Documentos, 15).
- BILLERBECK, V. G. et al. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 9-17, Jan. 2001.
- 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.
- BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.
- BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-580, 2005.
- 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**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.
- CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 1, n. 4, p. 399-406, 2009.

CAVALCANTI, F. R. et al. 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.

CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of American society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 3, p. 458-462, May 1990.

CHLAN, C. A.; BOURGEOIS, R. P. Class 1 chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): characterization, expression and purification. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 1, p. 143-154, Jan. 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**, Shannon, v. 127, n. 1, p. 1-16, Jan. 1997.

CIBA SPECIALITY CHEMICALS. **A plant activator for disease protection**. Basel, 1995. 9 p.

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

COSTA, C. M. G. R. et al. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 11-14, 2008.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010.

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

FIORI, A. C. G. et al. 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. 483-487, Aug. 2000.

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

GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS.  
**Tomate:** safra 2010/2011. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

GULERIA, S.; KUMAR, A. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against *Alternaria* leaf spot disease. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istanbul, v. 5, n. 1, p. 81-86, Jan. 2006.

HAMMERSCHMIDT, D.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, Mar. 1982.

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.

HELAL, G. A. et al. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 47, n. 1, p. 5-15, 2007.

KAGADE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 1, p. 91-100, Jan./Feb. 2004.

KARAMAN, Í. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 85, n. 2/3, p. 231-235, Feb. 2003.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-59, 1994.

KUHN, O. J. et al. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./jun. 2006.

LEMOS, T. L. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from brazilian plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 63, n. 2, p. 266-268, 1992.

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

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LUCAS, G. C. et al. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 94, n. 1, p. 45-51, Jan. 2012.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 12, n. 4, p. 516-520, July 2010.

MARTINS, J. A. S. et al. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 49-51, Jan./Feb. 2010.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 2, p. 175-783, Apr. 2009.

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

MIZUBUTI, E. S. G.; BROMMONSHENKEL, S. H. Doenças causadas por fungos em tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 180, p. 7-14, 1996.

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 61, n. 5, p. 616-619, May 1998.

MOREIRA, C. G. A. et al. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 34, n. 4, p. 332-337, out./dez. 2008.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 329-334, Aug. 2004.

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

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A. B.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* ( DC.). Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 12, n. 3, p. 279-286, Dec. 1984.

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: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-454.

PAUL, P. K.; SHARMA, P. D. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 1, p. 3-13, Feb. 2002.

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 Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1998.

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, 2008.

PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 171-178, jan. 2008.

\_\_\_\_\_. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeiteiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

\_\_\_\_\_. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

PERINI, V. B. M. et al. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 2, p. 23-27, May 2011.

PINTO, J. E. B. P. et al. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222 p.

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

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie**, London, v. 36, n. 7, p. 679-684, Nov. 2003.

RIOS, S. A. et al. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, agente causal da flor preta do morangueiro (fragaria x *Ananassa dulch.*) com extrato de citronela (*Cymbopogon* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: UFU, 2003. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, T. T. M. S. **Morphological, molecular characterization, and inference about recombination, for species of Alternaria related to early blight of potato and tomato**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

ROMERO, A. L. et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 11, n. 4, p. 15-18, 2009.

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

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolares sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SANTOS, F. S. et al. 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.

SANTOS, M. P. et al. Eficiência in vitro de óleos essenciais no controle de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 335, ago. 2001. Suplemento.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 291-304, Oct. 1994.

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.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 554-556, jul./ago. 2003.

SHAFIQUE, S.; MAJEED, R. A.; SHAFIQUE, S. *Cymbopogon citrates*: a remedy to control selected *Alternaria* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, Victoria, v. 6, n. 10, p. 1879-1885, Mar. 2012.

SILVA, I. D. da et al. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SILVA, J. C. **Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no controle alternativo do mal-do-Panamá da bananeira**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/EDUFSC, 1999. 1104 p.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, Sept. 2007.

SNOUSSI, M. et al. In-vitro anti-vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 3071-3076, 2008.

SOUZA, S. M. C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004.

SRIDHAR, S. R. et al. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 26, p. 7596-7599, Nov. 2003.

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. Thesis (Ph.D.) - University of Hohenheim, Stuttgart, 1999.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência, 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, p. 235-270, 1997.

STINTZI, A. et al. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

SUKATTA, U. et al. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against postharvest decay fungi of grape in vitro. **Kasetsart Journal: Natural Science**, Bancoc, v. 42, p. 169-174, 2008.

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

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliça**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 699-755.

VENTUROSOSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 536-539, jul./ago. 2004.

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.

WILSON, C. L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 2, p. 204-210, Feb. 1997.

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.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 491-494, Nov. 1996.

## CAPÍTULO 2

### Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro

#### RESUMO

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e no crescimento micelial de *Alternaria solani*, o efeito sobre a morfologia e a ultraestrutura do patógeno e seu efeito sobre a severidade da pinta preta do tomateiro. Foram avaliados, *in vitro*, os óleos essenciais de citronela, cravo-da-índia, canela, capim-limão, eucalipto, tomilho e árvore-de-chá, na concentração de 0,1% em 1,0% de leite em pó. Avaliou-se também, em casa de vegetação, o efeito destes mesmos óleos na mesma concentração sobre a severidade da pinta preta do tomateiro. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, avaliou-se o efeito dos óleos essenciais de citronela e capim-limão, 0,1% sobre *A. solani*. Todos os óleos essenciais, exceto o óleo essencial de eucalipto, apresentaram efeito direto *in vitro*. Em casa de vegetação, todos os óleos essenciais promoveram redução na severidade da pinta preta do tomateiro. Observações em microscópio eletrônico de varredura mostraram que os óleos essenciais são capazes de atrasar a germinação de conídios de *A. solani* e causam plasmolização das hifas, o que leva à redução do crescimento micelial do fungo. Dessa forma, conclui-se que os óleos essenciais testados reduzem a severidade da doença, causam alterações na estrutura e reduzem o desenvolvimento do patógeno.

Palavras-chave: *Alternaria solani*. Controle alternativo de doenças. Microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

Objectives of this work were to evaluate the effect of essential oils of medicinal plants in germination and mycelial growth of *Alternaria solani*, the effect on the morphology and ultrastructure of the pathogen and its effect on the severity of early blight of tomato. Were evaluated in vitro the essential oils of citronella, clove, cinnamon, lemongrass, eucalyptus, thyme and tea-tree, at a concentration of 0.1% in 1.0% of powdered milk. Was also evaluated in greenhouse the effect of these same oils in the same concentration on severity of early blight of tomato. By scanning electron microscopy, we evaluated the effect of essential oils of citronella and lemongrass, 0.1% of *A. solani*. All essential oils except eucalyptus essential oil showed a direct effect in vitro. In the greenhouse, all essential oils promoted a reduction in the severity of early blight of tomato. Observations by scanning electron microscopy showed that essential oils are able to delay the germination of spores of *A. solani* and cause hyphae plasmolysis which leads to reduction in mycelial growth. Thus, it is concluded that the essential oils tested reduce the severity and cause changes in the structure and reduce the development of the pathogen.

Keywords: *Alternaria solani*. Alternative control of diseases. Scanning electron microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil, com cerca de 3,36 milhões de toneladas por ano. Seu mercado é caracterizado pelo giro da ordem de 1,5 bilhões de reais e o cultivo, com 61,8 mil hectares, envolve diretamente mais de 200 mil pessoas na produção (GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS - GCEA, 2011).

A pinta preta, também conhecida por mancha de alternaria, é uma das doenças foliares mais frequentes e importantes da cultura do tomateiro no Brasil (VALE et al., 2000), causada por fungos do gênero *Alternaria*, entre eles *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, *Alternaria tomatophila* Simmons e *Alternaria cretica* Simmons (RODRIGUES, 2009). Esta doença ocorre em praticamente todas as regiões onde se cultiva o tomateiro.

A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. O aumento de suscetibilidade à pinta preta está, geralmente, associado a tecidos maduros, sendo mais frequente durante a fase de frutificação. A ocorrência de epidemias severas da doença está associada a temperaturas na faixa de 25 °C a 32 °C e elevada umidade, sendo caracterizada por intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, quebra de caules e depreciação de frutos (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Atualmente, o pequeno número de cultivares com resistência genética a essa doença, associado ao alto custo de suas sementes, determina medidas de controle, basicamente, com produtos químicos, para as variedades tradicionalmente cultivadas que são suscetíveis ao patógeno (VALE et al., 2000). O uso de produtos químicos, muitas vezes realizado de maneira abusiva e indiscriminada, pode gerar a poluição ambiental e a seleção de patógenos

resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007). Neste contexto, temos a agricultura alternativa, que busca medidas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (ZADOKS, 1992).

As plantas medicinais têm, em sua composição, substâncias do metabolismo secundário, as quais 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 essenciais dessas plantas têm como vantagem o fato de não poluírem o ambiente e serem considerados como alternativa no controle de fitopatógenos (STANGARLIN et al., 1999), seja por sua atividade fungitóxica (BONALDO et al., 2004) ou bactericida (VIGO-SCHULTZ et al., 2006). A determinação da atividade biológica desses compostos em relação à sua atividade eliciadora ou antimicrobiana pode contribuir na aquisição de maiores conhecimentos para reforçar a sua utilização no controle de doenças de plantas.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito de óleos essenciais na inibição direta da germinação e do crescimento micelial de *Alternaria solani* e seus efeitos sobre a morfologia e ultraestrutura do patógeno por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), além da eficiência dos óleos na redução da severidade da pinta preta do tomateiro.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados de janeiro de 2009 a dezembro de 2011, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, Brasil. Os óleos essenciais avaliados nos experimentos foram adquiridos da Brasil Portrait (2009)

e o isolado utilizado de *Alternaria solani* foi obtido a partir de isolamento em meio batata dextrose ágar (BDA), a partir de folhas de tomateiro naturalmente infectadas. Posteriormente, para o preparo da suspensão de conídios, o fungo foi cultivado em BDA, por um período de cinco dias, com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C. A concentração da suspensão de conídios utilizada em todos os experimentos foi ajustada para  $3,6 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup> em hemocitômetro.

Para avaliar o potencial de inibição dos óleos essenciais na germinação de conídios de *A. solani* foram utilizados os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Staph), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson) e árvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia* Cheel), Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (fungicida à base de cobre) e leite em pó 1,0%, utilizado como emulsificante. Foram utilizados, como controle, água e leite em pó 1,0%. O teste de germinação foi realizado em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo 10 mL de meio ágar-água 2,0%. Os óleos foram ajustados na concentração de 1.000 µL L<sup>-1</sup> para a quantidade de meio de cultura e devidamente distribuídos em cada placa, exceto na testemunha, na qual foi utilizada somente água destilada. Sobre o meio foram depositados 50 µL da suspensão de conídios ( $3,6 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>) de *A. solani*. A suspensão de conídios foi espalhada com alça de Drigalsky e as placas foram acondicionadas em BOD, a 25 °C, onde permaneceram por 24 horas, com um regime de 12 horas de luz. Após a incubação, a germinação dos conídios foi paralisada com solução de lactoglicerol e, em microscópio de luz, foi avaliada a percentagem de germinação dos conídios. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição constituída de um quadrante da placa, tendo sido avaliados 30 conídios por quadrante.

Foram considerados germinados conídios com tubo germinativo com 1/3 do tamanho do esporo.

No intuito de avaliar o efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *A. solani*, foram utilizados os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia, eucalipto citriodora, canela, citronela, árvore-de-chá e capim-limão, na concentração de 1000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ; o fungicida Recop<sup>®</sup>, na concentração de 2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ , testemunha (meio BDA) e leite em pó a 1,0%, utilizado como emulsificante. Os tratamentos foram adicionados ao meio BDA e homogeneizados. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, nas quais foi depositado um disco de micélio com 0,6 cm de diâmetro no centro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. As placas foram mantidas em BOD, a 25 °C. Avaliou-se o diâmetro das colônias diariamente e calculou-se o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) segundo Maguire (1962).

Para avaliar o efeito dos mesmos óleos essenciais utilizados nos experimentos anteriores *in vivo*, foi realizado um teste em casa de vegetação, wem que sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada altamente susceptível ao patógeno foram semeadas em vasos de 5 L contendo substrato comercial composto por vermiculita expandida, material orgânico, macro e micronutrientes como recomendado para a cultura. Os óleos essenciais foram utilizados na concentração de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  em 1,0% de leite em pó (emulsificante natural). Foram utilizados, ainda, dois tratamentos adicionais, um como padrão de indução de resistência, acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup> 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e outro como padrão de fungicida à base de cobre (Recop<sup>®</sup> 2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), além das testemunhas inoculada, absoluta e leite em pó 1,0%.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com 12 tratamentos, cinco repetições e parcela constituída de três plantas.

No intuito de avaliar o modo de ação dos óleos essenciais, foram avaliadas três épocas de tratamento, sendo: A - plantas pulverizadas somente antes da inoculação; D – plantas pulverizadas somente após a inoculação e AD – plantas pulverizadas semanalmente antes e após a inoculação, até o final do experimento. As aplicações em A e AD foram realizadas 23 dias após a semeadura, enquanto em D a aplicação ocorreu 37 dias após a semeadura. Todas as plantas foram inoculadas 30 dias após a semeadura. A inoculação foi feita em plantas previamente expostas à câmara úmida por 24 horas, mediante pulverização foliar, até o ponto de escorrimento. Posteriormente, efetuou-se nova câmara úmida por um período de 24 horas, para garantir a eficiência da inoculação.

As avaliações de severidade da pinta preta foram realizadas semanalmente e iniciaram-se dez dias após a inoculação, de acordo com a escala de Boff et al. (1991), a qual possui cinco níveis de infecção: 1 - ausência de sintomas; 2 - de traços de sintomas a 4% de severidade; 3 - 4,1% a 8%; 4 - 8,1% a 16%; 5 - 16,1% a 32% e 6 - acima de 32% de área foliar lesionada. Foram realizadas cinco avaliações.

A partir dos dados de severidade, foi calculada a eficiência de cada tratamento.

O efeito dos óleos essenciais sobre *A. solani* foi avaliado em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os óleos essenciais de capim-limão e citronela a  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$  foram previamente selecionados no ensaio realizado em casa de vegetação. Leite em pó 1,0% foi utilizado como emulsificante para os tratamentos à base de óleo; Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi utilizado como tratamento padrão à base de cobre; ASM  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  foi utilizado como tratamento padrão de indução de resistência e uma testemunha inoculada. Plantas de tomateiro com bom crescimento vegetativo foram pulverizadas com óleos essenciais e, após 24 horas, tiveram a quinta folha (sentido descendente)

coletada e acomodada em bandejas plásticas previamente desinfetadas com álcool. Foi colocada, no fundo de cada bandeja, uma lâmina de espuma sintética umedecida com água destilada esterilizada, coberta por duas folhas de papel germitest também umedecidas. Em seguida, foram desenhados círculos de 1 cm de diâmetro na superfície adaxial de cada uma das sete folhas coletadas em cada tratamento. No centro de cada círculo, foi colocada uma gota de 25 µL de suspensão de  $3,6 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com plástico transparente e mantidas em câmara de crescimento, a 24 °C, até o final das coletas.

As coletas das amostras para observação em MEV foram realizadas nos tempos 6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas após inoculação. Foram coletados, com um bisturi, fragmentos de 5 mm de diâmetro, dentro de cada círculo em que foram feitas as inoculações. Estes fragmentos foram colocados em microtubos de 1,5 mL contendo fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% em tampão de cacodilato de sódio 0,05M, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M, pH 7,2) e, em seguida, armazenados em geladeira, a 4 °C.

Depois que o material foi imerso em solução fixativa Karnovsky por um período de, no mínimo, 24 horas, seis fragmentos de cada tratamento foram transferidos para solução tampão de cacodilato 0,05 M e lavados, três vezes, durante 10 minutos. As secções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água, por 1 hora, lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez cada e 100% por três vezes). Após essa desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio stubs com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. As imagens geradas

foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 13, para preparação das pranchas apresentadas neste trabalho.

### 3 RESULTADOS

Em relação à inibição *in vitro* da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Alternaria solani*, observou-se que os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e canela e o fungicida Recop<sup>®</sup> inibiram praticamente em 100,0% a germinação dos conídios, sem diferirem estatisticamente entre si (Figura 1). Os óleos de árvore-de-chá, citronela e capim-limão inibiram parcialmente a germinação dos conídios, enquanto o óleo essencial de eucalipto e o leite em pó não inibiram a germinação.

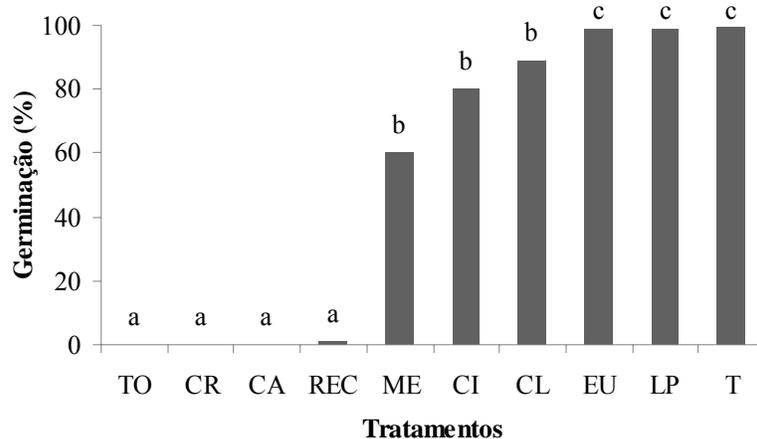


Figura 1 Efeito dos óleos essenciais sobre a germinação de conídios de *Alternaria solani*. Tomilho (TO), cravo-da-índia (CR), canela (CA), capim-limão (CL), árvore-de-chá (ME), citronela (CI) e eucalipto citriodora (EU), na concentração de  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ ; Recop<sup>®</sup> (REC)  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , leite em pó (LP) 1,0% e testemunha (T). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação ao crescimento micelial, os tratamentos com melhor efeito foram os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e canela, que inibiram totalmente o crescimento micelial do patógeno, seguidos pelo fungicida Recop<sup>®</sup> (Figura 2). Os óleos essenciais de capim-limão, árvore-de-chá e citronela apresentaram controles intermediários e o óleo essencial de eucalipto e o leite em pó não apresentaram toxidez sobre o crescimento micelial do fungo em questão.

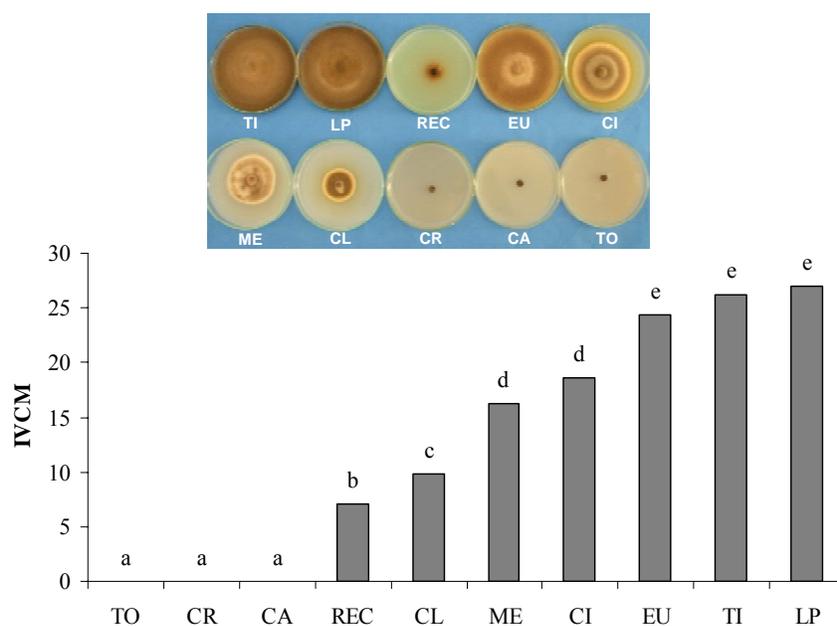


Figura 2 Efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Alternaria solani*. Tomilho (TO), cravo-da-índia (CR), canela (CA), capim-limão (CL), árvore-de-chá (ME), citronela (CI) e eucalipto citriodora (EU) na concentração de  $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ ; Recop<sup>®</sup> (REC)  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , leite em pó (LP) 1,0% e testemunha (T). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

No experimento conduzido em casa de vegetação, a eficiência dos tratamentos variou em função das diferentes épocas de aplicação, o que evidencia uma interação entre época de aplicação e tratamento. Nas plantas pulverizadas somente antes da inoculação (A), os tratamentos acibenzolar-S-metil (ASM) e o óleo essencial de capim-limão proporcionaram as maiores porcentagens de controle da pinta preta, 82% e 81%, respectivamente, seguidos de Recop<sup>®</sup> e dos óleos essenciais de citronela, árvore-de-chá, eucalipto e tomilho, com controles de 63%, 59%, 59%, 48% e 42%, respectivamente (Figura 3A). O tratamento menos eficiente foi o leite em pó, com 8% de controle da doença.

Como observado na Figura 3B, os tratamentos Recop<sup>®</sup>, ASM e os óleos essenciais de citronela e capim-limão foram os mais eficientes na redução da severidade da doença em mudas pulverizadas semanalmente, antes e após a inoculação, os quais apresentaram controles de 76%, 74%, 65 e 62%, respectivamente. Os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia, árvore-de-chá, canela e eucalipto diferiram dos demais e apresentaram controles de 50% a 37%. O controle mais eficiente da pinta preta do tomateiro observado em plantas tratadas somente uma vez após a inoculação foi obtido pelo fungicida Recop<sup>®</sup>, o qual apresentou controle de 77% (Figura 3C). Todos os óleos essenciais avaliados e o tratamento padrão ASM apresentaram controles de 60% a 42%. O leite em pó não foi eficiente no controle da pinta preta do tomateiro nas pulverizações semanais, antes e após a inoculação e somente após a inoculação.

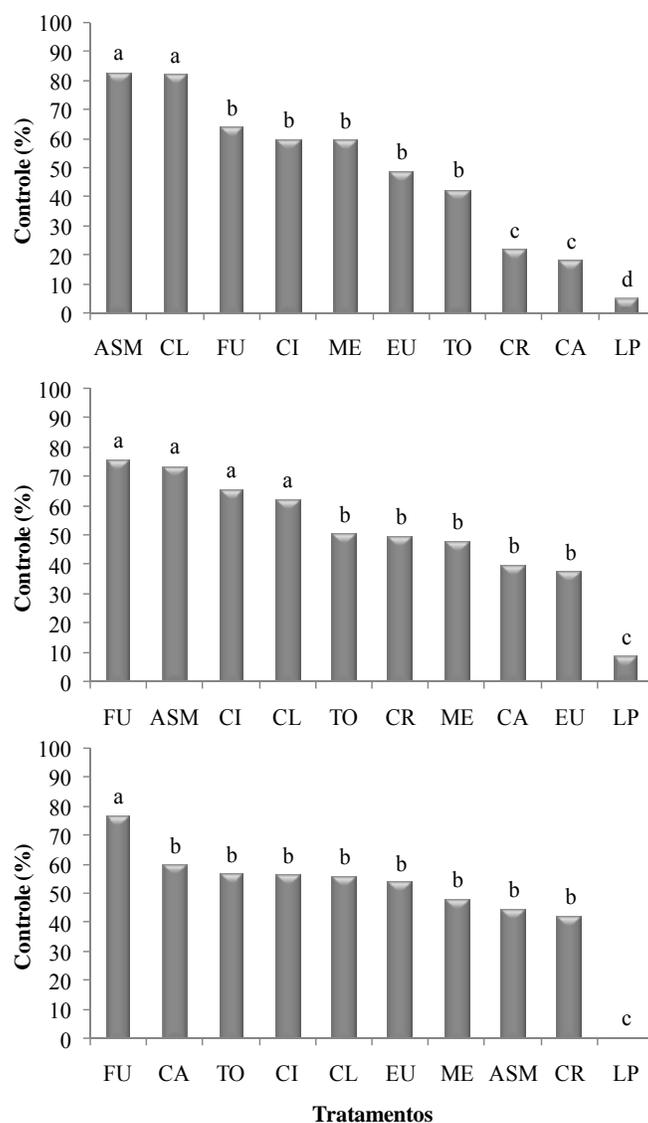


Figura 3 Percentual de controle dos óleos essenciais sobre o progresso da pinta preta do tomateiro em três diferentes épocas de aplicação. Canela (CA), citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR), eucalipto (EU), árvore-de-chá (ME) e tomilho (TO) na concentração de  $1,000 \mu\text{L L}^{-1}$ ; acibenzolar-S-metil (ASM)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , Recop<sup>®</sup> (FU)  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e leite em pó (LP) 1,0%. Aplicação somente antes da inoculação (A), antes e após a inoculação, semanalmente (B) e somente após a inoculação (C). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Nas imagens geradas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), observou-se que a germinação de conídios de *Alternaria solani* inicia-se em menos de seis horas após a inoculação em tomateiro. Seis horas após a inoculação, grande parte dos conídios presentes nas plantas testemunhas havia germinado (Figura 4A), enquanto conídios presentes nas plantas pulverizadas com ASM e óleo de citronela germinaram parcialmente (Figura 4B e 4D, respectivamente). Conídios presentes nas plantas pulverizadas com óleo essencial de capim-limão (Figura 4C) e o fungicida Recop<sup>®</sup> (Figura 4E) não germinaram, o que evidencia o potencial dos óleos em atrasar o processo de infecção.

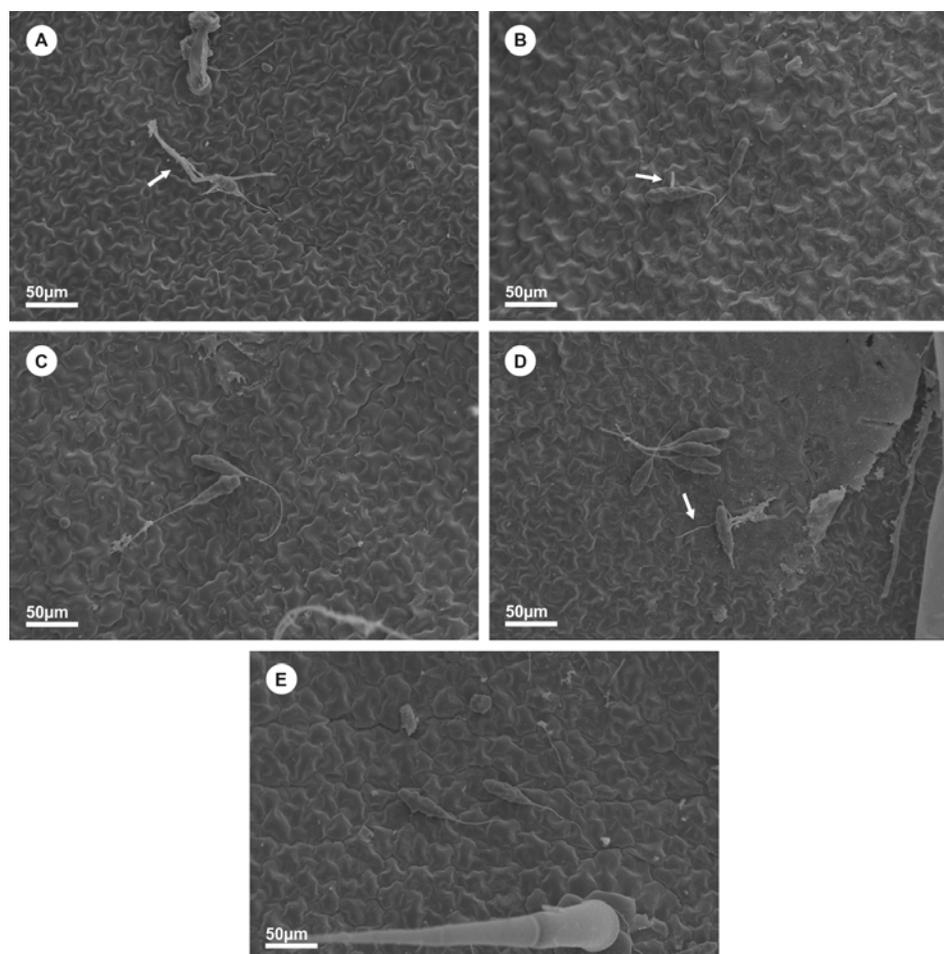


Figura 4 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), seis horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam germinação de conídios.

Doze horas após a inoculação, os conídios de *A. solani* presentes nas plantas testemunhas e pulverizadas com ASM e óleo de citronela apresentavam-se em avançado processo de germinação (Figuras 5A, 5B e 5D). Neste mesmo período, conídios de *A. solani* presentes em plantas de tomateiro pulverizadas

com óleo essencial de capim-limão (Figura 5C) e fungicida Recop<sup>®</sup> (Figura 5E) ainda não haviam germinado.

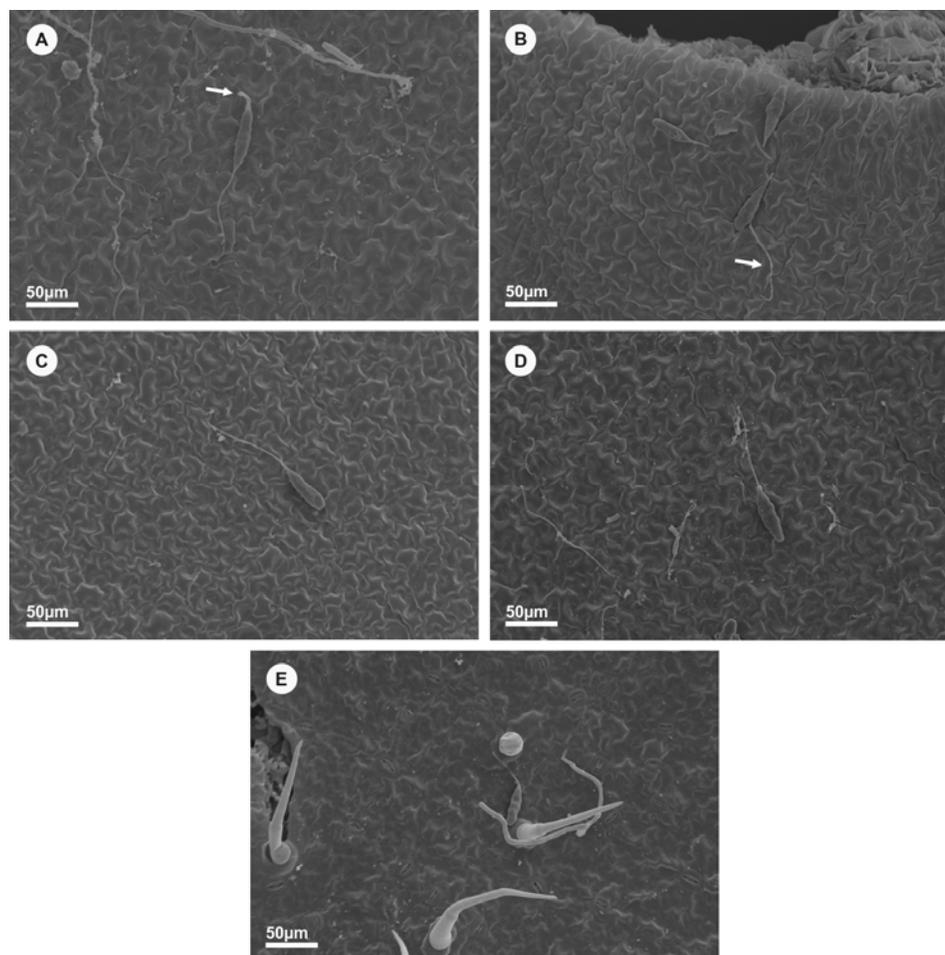


Figura 5 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 12 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam germinação de conídios.

Vinte e quatro horas após a inoculação, conídios presentes em plantas pulverizadas com ASM (Figura 6B) e óleo essencial de capim-limão (Figura 6C) ainda estavam em processo de germinação. O desenvolvimento micelial foi observado nas plantas testemunhas (Figura 6A) e pulverizadas com óleo de citronela (Figuras 6D) e fungicida (Figuras 6E).

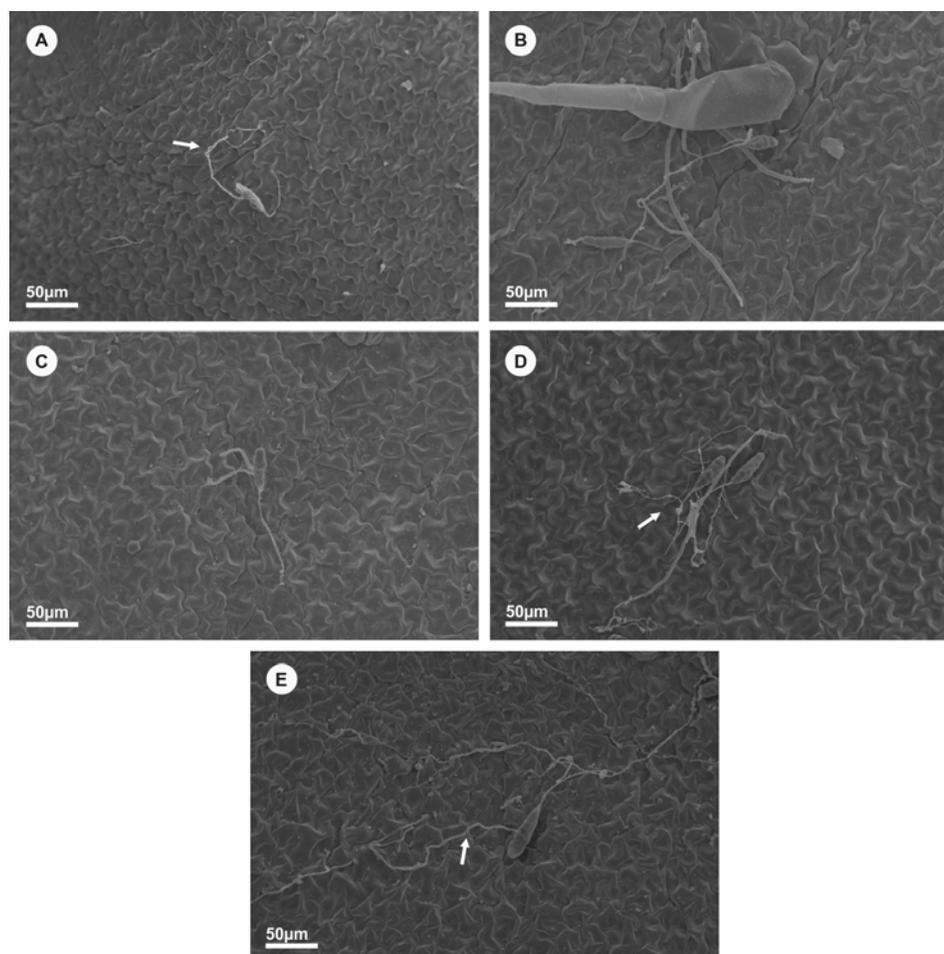


Figura 6 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 24 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam hifas plasmolisadas.

Trinta e seis horas após a inoculação, observou-se que o patógeno encontrava-se em processo de penetração e colonização em todos os tratamentos (Figura 7). Entretanto, o micélio presente em plantas tratadas com os óleos essenciais de capim-limão e citronela e fungicida apresentava-se plasmolizado

(Figuras 7C, 7D e 7E). Mesmo efeito pôde ser observado 48, 72 e 96 horas após a inoculação (Figuras 8, 9 e 10).

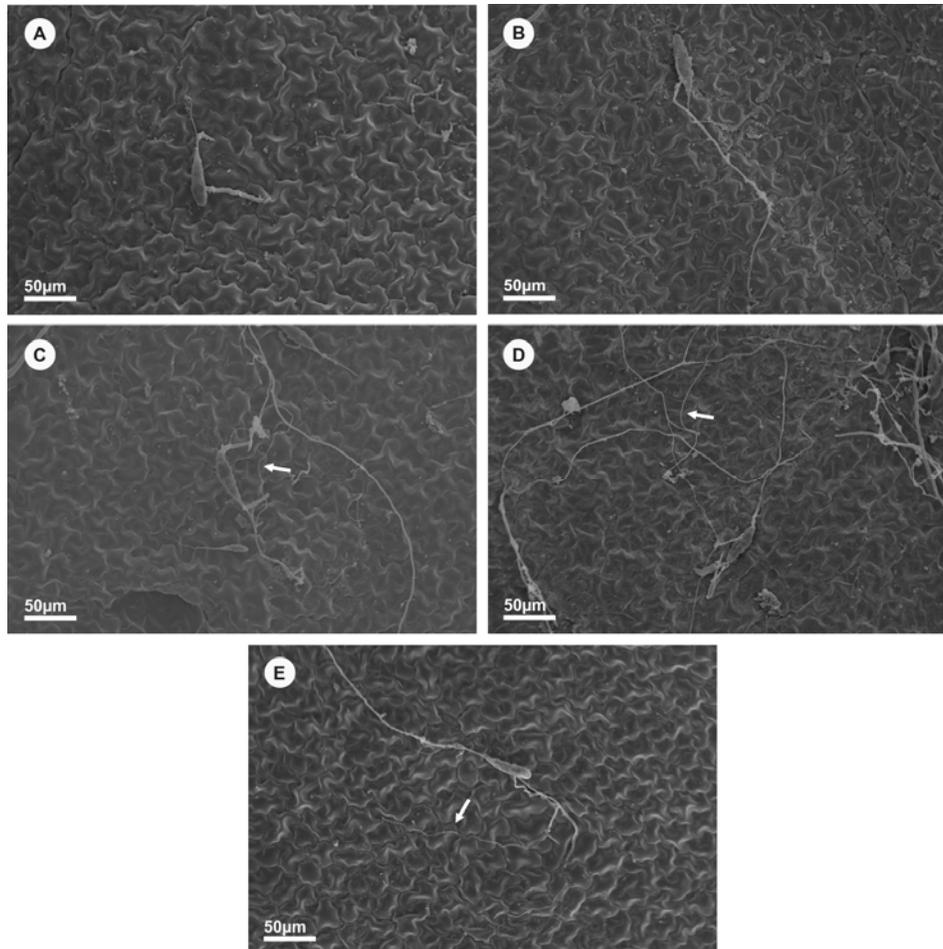


Figura 7 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 36 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam hifas plasmolisadas.

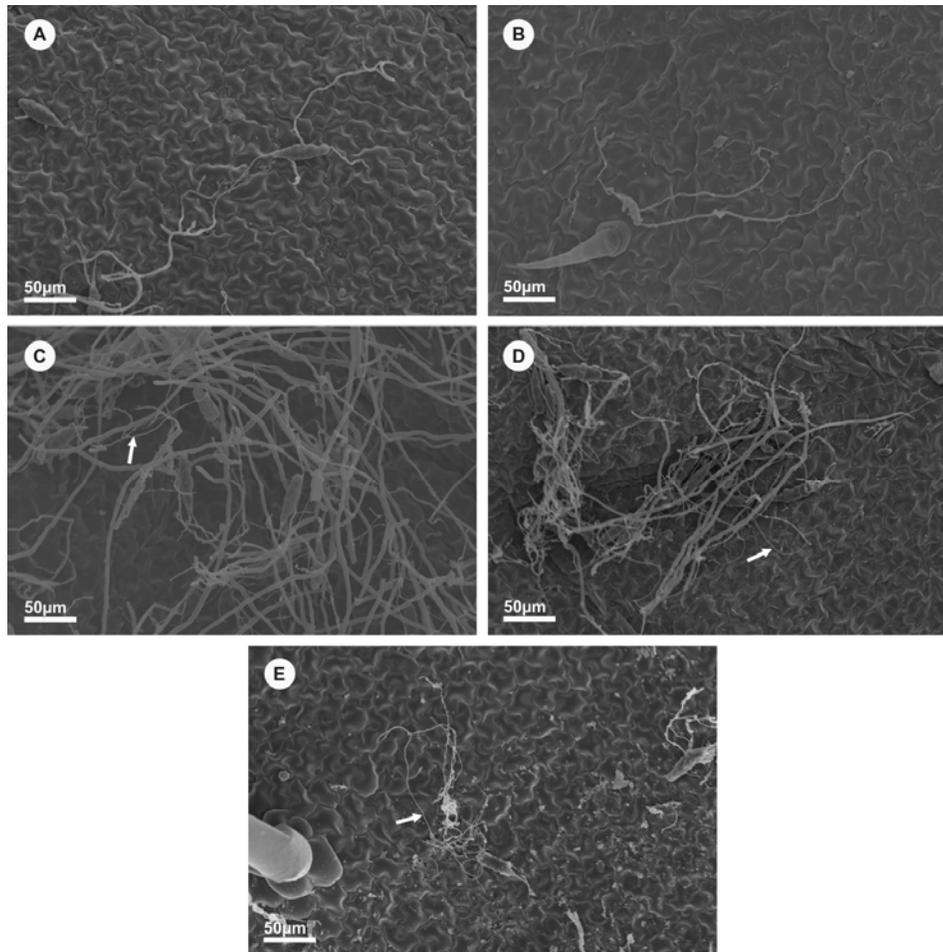


Figura 8 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 48 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam hifas plasmolizadas.

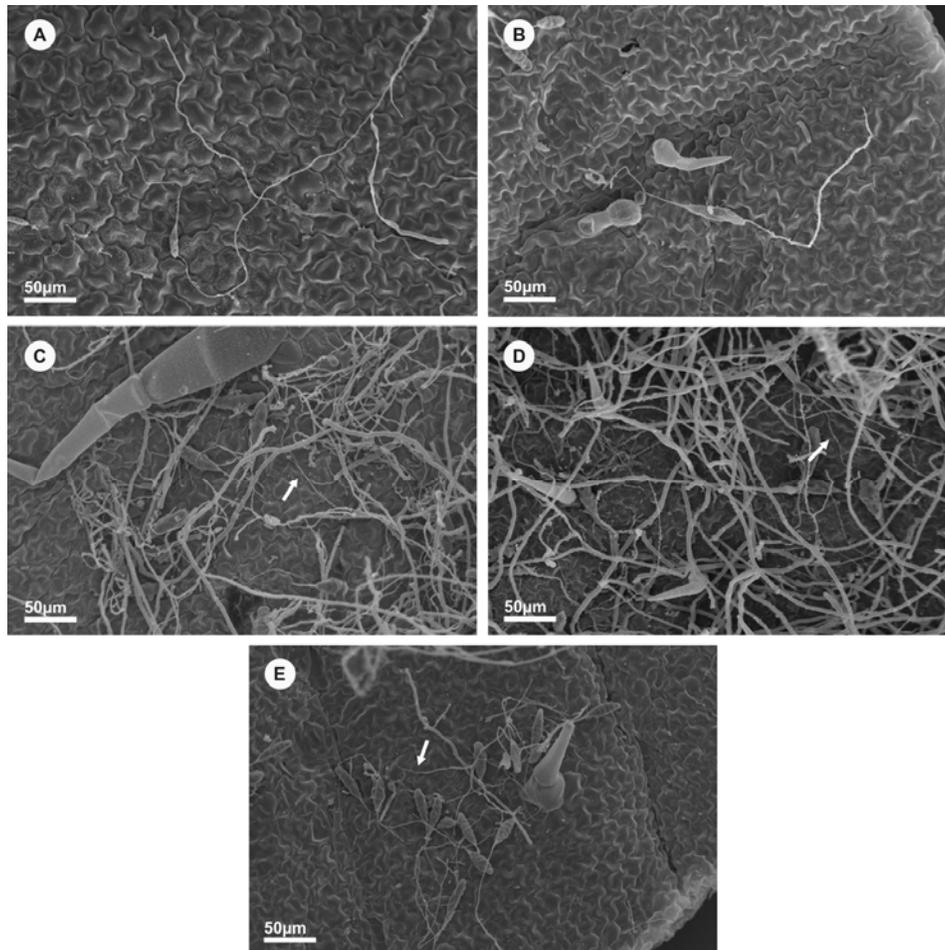


Figura 9 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ µL L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ µL L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 72 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam hifas plasmolizadas.

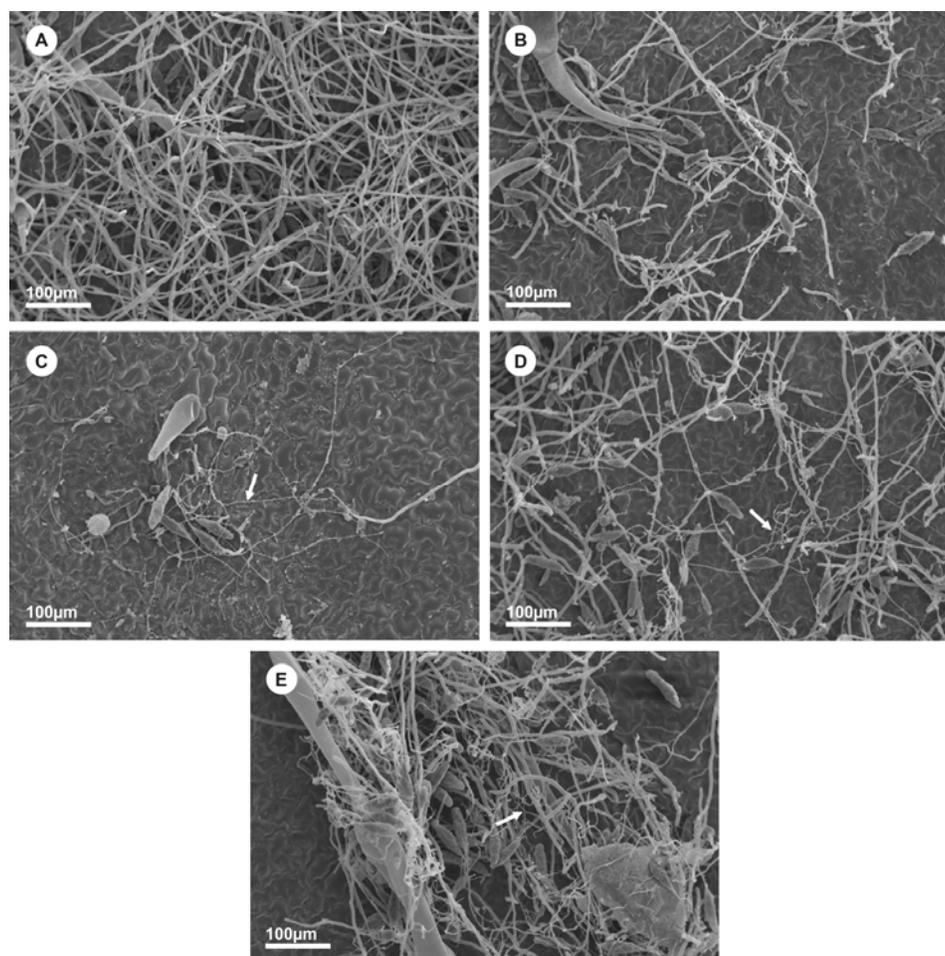


Figura 10 Eletromicrografia de varredura de plantas de tomateiro pulverizadas com água destilada (testemunha) (A), acibenzolar-S-metil  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (B), óleos essenciais de capim-limão  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (C) e citronela  $1.000 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$  (D) e fungicida Recop<sup>®</sup>  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (E), 96 horas após inoculação com *Alternaria solani*. Setas indicam hifas plasmolizadas.

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que óleos essenciais são produtos promissores no controle da pinta preta do tomateiro e apresentam

atividade direta sobre o patógeno. Os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e canela apresentaram efeito fungitóxico, inibindo em quase 100% a germinação de conídios e totalmente o crescimento micelial de *Alternaria solani*. Os outros óleos, com exceção do de eucalipto, apresentaram controles intermediários, mas também promissores. Este efeito já foi comprovado anteriormente em outros patógenos. Pereira et al. (2011) verificaram o efeito dos óleos de canela, tomilho, cravo-da-índia e árvore-de-chá sobre *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke. Maqbool, Ali e Alderson (2010) comprovaram o efeito do óleo essencial de canela sobre *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx. e Rozwalka et al. (2008), do óleo essencial de capim-limão sobre *Glomerella cingulata* (Stonemam) Spauld & Schrenk e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Arx (= *Gloeosporium psidii* Delacr.). Lorenzetti et al. (2011) comprovaram efeito dos óleos essenciais de capim-limão e canela sobre *Botrytis cinerea* Pers. Fr e Lucas et al. (2012) verificaram o efeito dos óleos de canela, citronela, capim-limão, cravo-da-índia, eucalipto, tomilho e árvore-de-chá sobre a bactéria *Xanthomonas vesicatoria*.

De acordo com Caccioni e Guizzardi (1994), óleos essenciais têm grandes quantidades de monoterpenos (d-limonene, cineole, b-myrcene, anethole, p-anisaldehyde, carvacrol, carvone, limonene, -felandreno, -pinene, etc.), responsáveis pela inibição da germinação de vários patógenos, por meio de suas propriedades fungicidas e bactericidas.

Os óleos essenciais também foram promissores na redução da severidade da pinta preta do tomateiro. Foi possível perceber que a época da aplicação dos produtos tem grande influência em seu resultado. Os óleos essenciais aplicados somente antes da inoculação de *A. solani* apresentaram controle da doença que variou de 42% a 81%. Em plantas pulverizadas semanalmente, antes e após a inoculação, a variação de controle foi de 37% a 65% e, em plantas pulverizadas somente após a inoculação, o controle

promovido pelos óleos essenciais foi de 42% a 60%. O grande efeito dos óleos no controle da pinta preta do tomateiro, quando pulverizados antes da inoculação e de forma semanal, provavelmente se deve ao efeito fungitóxico dos óleos, como relatado anteriormente. Dessa forma, ao ocorrer a inoculação, os conídios do fungo entraram imediatamente em contato com os óleos essenciais, promovendo inibição ou, até mesmo, o retardo da germinação e do crescimento micelial destes.

O máximo de controle (81%) deve-se também ao efeito do óleo essencial de capim-limão que atuou à semelhança do produto indutor de resistência padrão, o ASM. Óleos essenciais podem, comprovadamente, atuar como indutores de resistência, como observado por Lucas et al. (2012) e Pereira et al. (2008). Os resultados observados neste trabalho corroboram os relatados por outros autores.

Abreu (2006) observou reduções de 26,0% a 95,0% na incidência da pinta preta do tomateiro, em plantas tratadas com óleo essencial de canela. Pereira et al. (2008) obtiveram redução de 35,0% na área abaixo da curva de progresso do número de lesões da cercosporiose do cafeeiro, promovida pela pulverização do óleo essencial de tomilho. Os autores também observaram controle promovido pelos óleos essenciais de canela e citronela e relataram que esta eficiência deve-se à presença de compostos como cinemaldeídos e eugenol, presentes no óleo de canela e geraniol e citronelal, presentes no óleo de citronela. Segundo Montes-Belmont e Carvajal (1998), estes são os componentes com maiores propriedades antimicrobianas presentes nestes óleos.

A microscopia eletrônica de varredura feita com os as amostras tratadas com os óleos essenciais mais efetivos no controle da doença, capim-limão e citronela, indicou que os óleos essenciais atrasam o processo de germinação dos conídios, podendo atuar de forma fungistática e não fungitóxica, como se acreditava. Observou-se também que hifas apresentavam-se murchas, sem seu

conteúdo citoplasmático, ou seja, plasmolisadas. Segundo Piper et al. (2001), as substâncias presentes nos óleos essenciais, quando em contato com os microrganismos, afeta a integridade das células da membrana, causando o extravasamento de seu conteúdo. Este fato também foi observado por Medice et al. (2007), em soja pulverizada com óleo essencial de tomilho e inoculada com *P. pachyrhizi*, por Pereira et al. (2008), utilizando o mesmo óleo em plantas de cafeeiro inoculadas com *C. coffeicola* e por Cox et al. (2000), em *Saccharomyces* sp. exposta ao óleo essencial de árvore-de-chá.

A compreensão do mecanismo de ação desses óleos essenciais e seus efeitos sobre a morfologia e fisiologia deste fungo fitopatogênico permitirá o uso racional e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de patógenos de plantas.

## 5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de canela, citronela, capim-limão, cravo-da-índia, tomilho e árvore-de-chá apresentam efeito direto sobre a germinação e o crescimento micelial de *A. solani*.

Os óleos essenciais de canela, citronela, capim-limão, cravo-da-índia, tomilho, eucalipto e árvore-de-chá reduzem parcialmente a severidade da pinta preta do tomateiro.

Óleos essenciais de capim-limão e citronela atrasam a germinação de conídios de *A. solani* e causam plasmolisação das hifas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de alternaria solani em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.
- BOFF, P. et al. Escalas para avaliação de severidade da mancha de estenfilio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 280-283, out./dez. 1991.
- 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.
- BRASIL PORTRAIT. **Óleos essenciais**. Disponível em: <<http://www.brasilportrait.com.br>>. Acesso em: 24 maio 2009.
- CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Camberra, v. 6, n. 2, p. 173-179, Mar./Apr. 1994.
- COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil *Melaleuca alternifolia*: tea tree oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 170-175, Apr. 2000.
- FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.
- GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS. **Tomate**: safra 2010/2011. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 5 ago. 2011.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 607-626.
- LORENZETTI, E. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 619-627, 2011. Número especial.

LUCAS, G. C. et al. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 94, n. 1, p. 45-51, Feb. 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Jan. 1962.

MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 12, n. 4, p. 516-520, July 2010.

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

MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 61, n. 5, p. 616-619, May 1998.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

\_\_\_\_\_. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, Oct. 2001.

RODRIGUES, T. T. M. S. **Morphological, molecular characterization, and inference about recombination, for species of Alternaria related to early blight of potato and tomato**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

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

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, mar./abr. 1999.

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliça**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 699-755.

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.

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 3

### Respostas de defesa induzidas pelo óleo essencial de capim-limão em tomateiro contra *Alternaria solani*

#### RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial do óleo essencial de capim-limão na redução da pinta preta do tomateiro e na ativação de algumas respostas de defesa da planta. O óleo essencial de capim-limão ( $1.000\mu\text{L L}^{-1}$ ) e o fungicida Recop<sup>®</sup> ( $2,0\text{ mg mL}^{-1}$ ) inibiram o crescimento micelial de *A. solani*, diferentemente de acibenzolar-S-metil (ASM,  $0,2\text{ mg mL}^{-1}$ ). Plantas de tomateiro foram pulverizadas com óleo essencial de capim-limão e inoculadas com *A. solani*, sete dias depois. ASM e Recop foram utilizados como controles. O óleo essencial de capim-limão apresentou controle de 62,2%, enquanto o ASM e o Recop apresentaram controles de 73,5% e 75,5%, respectivamente. A expressão da indução de resistência induzida pelo óleo de capim-limão e ASM foi evidente por meio do aumento das atividades de peroxidases, polifenoloxidase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. A inoculação, por si só, promoveu aumento nas atividades destas enzimas e o óleo essencial de capim-limão promoveu um aumento superior ao promovido pelo ASM. Não houve diferença significativa no teor de lignina e no teor de fenóis solúveis totais. O óleo essencial de capim-limão é um potencial indutor no controle da pinta preta do tomateiro.

Palavras-chave: *Alternaria solani*. Crescimento micelial. Lignina. Fenóis solúveis totais. PR proteínas. Indução de resistência.

## ABSTRACT

Objectives of this work were to evaluate the potential of essential oil of lemongrass in reducing the early blight of tomato and in the activation of some plant defense responses. The essential oils of lemongrass ( $1000\mu\text{L L}^{-1}$ ) and the fungicide Recop<sup>®</sup> ( $2.0\text{ mg mL}^{-1}$ ) inhibited the mycelial growth of *A. solani*, unlike acibenzolar-S-methyl (ASM,  $0.2\text{ mg mL}^{-1}$ ). Tomato plants were sprayed with essential oil of lemongrass and inoculated with *A. solani* seven days after. ASM and Recop were used as controls. The essential oil of lemongrass with control of 62.2%, while the ASM and Recop controls were 73.5% and 75.5%, respectively. The expression of induced resistance induced by oil of lemon grass and ASM was evident through the increased activity of peroxidases, polyphenol oxidase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases. Inoculation by itself promoted an increase the activities of these enzymes and the essential oil of lemongrass promoted an increase higher than promoted by the ASM. No significant differences in lignin content and total soluble phenolic content. The essential oil of lemongrass is a potential inducer in control of early blight of tomato.

Index terms: *Alternaria solani*. Mycelial growth. Lignin. Total soluble phenols. PR proteins. Inducing resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

A pinta preta, causada por fungos do gênero *Alternaria*, é uma das mais importantes e frequentes doenças da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e ocorre em praticamente todas as regiões de cultivo. O patógeno apresenta alto potencial destrutivo e incide sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos do tomateiro, ocasionando elevada desfolha e podridão dos frutos (KUROZAWA; PAVAN, 2005; PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2005; VALE et al., 2000).

O controle da pinta preta e de outras doenças do tomateiro tem se resumido em aplicações periódicas de fungicidas. Quando esta prática é realizada de maneira abusiva e indiscriminada, pode contribuir para a poluição ambiental e favorecer a seleção de patógenos resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007). Ademais, o uso excessivo de fungicidas pode promover a contaminação dos frutos por altos níveis de resíduos.

A preocupação com o ambiente e com a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, aliada à exigência cada vez maior do mercado consumidor em adquirir produtos saudáveis obtidos a partir de tecnologias de baixo impacto ambiental, tem demandado pesquisas na busca por medidas alternativas para o controle de doenças em plantas. Dessa forma, o emprego de agentes de controle biológico e o uso de indutores de resistência têm apresentado potencial para atender a esta demanda (DI PIERO; GUARDA, 2008).

A indução de resistência ocorre quando um agente indutor é reconhecido por um receptor da planta que, por sua vez, ativa seu sistema natural de defesa, levando a uma maior produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (quitinases, glucanases, peroxidases), fitoalexinas e compostos fenólicos (HEIL; BOSTOCK, 2002). Os indutores de resistência podem ser de origem biótica (microrganismos saprofitos, metabólitos microbianos, extratos de plantas,

óleos essenciais) ou abiótica (agentes químicos) (MANANDHAR et al., 1998). Uma vez imunizada, a planta tem seus mecanismos de defesa ativados por um longo período de tempo, geralmente até o florescimento, limitando, dessa forma, o número de aplicações necessárias para o controle efetivo da doença (ITAKO et al., 2008; LYON; REGLINSKI; NEWTON, 1995). Outra vantagem da resistência induzida é a proteção contra amplo espectro de patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Vários produtos químicos e naturais parecem atuar em diferentes pontos nas vias de ativação de defesa em plantas, imitando parte ou toda a ativação biológica de resistência. Entre os produtos químicos, acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência mais estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de Bion<sup>®</sup>, Actigard<sup>™</sup> e Boost<sup>®</sup> (VENÂNCIO et al., 2000). Em tomateiro, o ASM tem sido o mais estudado. Por outro lado, substâncias naturais derivadas de plantas medicinais têm apresentado resultados promissores no controle de doenças em diversas culturas (CARNEIRO, 2003; PEREIRA et al., 2011; PINTO; SOUZA; OLIVEIRA, 2010). Muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de elucidar os mecanismos de supressão de doenças em plantas, as quais sugerem que compostos ativos presentes nos óleos essenciais podem agir diretamente nos patógenos ou induzir resistência nas plantas hospedeiras, por meio da produção de compostos de defesa estruturais e bioquímicos, resultando na redução da doença (BALBI-PEÑA et al., 2006a; GULERIA; KUMAR, 2006; KAGADE et al., 2004; LUCAS et al., 2012; PAUL; SHARMA, 2002; PEREIRA et al., 2008; SCHNEIDER; ULLRICH, 1994; SCHWAN-ESTRADA, 2003).

Com o avanço nas pesquisas sobre extratos vegetais e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas, constata-se a existência de uma grande quantidade de compostos secundários em plantas medicinais com capacidade de ativar o sistema de defesa de diferentes plantas contra patógenos, tais como

*Cercospora coffeicola*, em cafeeiro (PEREIRA et al., 2008); *Phytophthora infestans*, em batateira (KE-QIANG; BRUGGEN, 2001); *Oidium lycopersici*, em tomateiro (CARNEIRO, 2003); *Alternaria solani*, em tomateiro (BALBI-PEÑA et al., 2006a, 2006b); *Xanthomonas vesicatoria*, em tomateiro (LUCAS et al., 2012); *Alternaria sesami*, em gergelim (GULERIA; KUMAR, 2006); *Drechslera graminea*, em cevada (PAUL; SHARMA, 2002) e *Ralstonia solani* e *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, em arroz (KAGADE et al., 2004).

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito do óleo essencial de capim-limão no controle da pinta preta do tomateiro e na ativação de respostas bioquímicas de defesa desenvolvidas em tomateiro contra *Alternaria solani*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *A. solani* utilizado para a produção do inóculo foi obtido de folhas de tomateiro naturalmente infectadas na região de Lavras, MG, Brasil. O isolamento do fungo foi feito em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA), as quais foram incubadas por quatro dias sob luz negra (NUV), a 25 °C, para a esporulação. A concentração da suspensão de conídios utilizada em todos os experimentos foi ajustada para  $3,6 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, em hemocitômetro.

O óleo essencial utilizado no trabalho foi adquirido da Brasil Portrait (2009).

Para avaliar o potencial de inibição do crescimento micelial de *A. solani*, foram utilizados o óleo essencial de capim-limão (OECL), na concentração de 1.000 µL L<sup>-1</sup> em 1,0% de leite em pó (utilizado como emulsificante para o

tratamento à base de óleo); o fungicida Recop<sup>®</sup> (REC), na concentração de 2,0 mg mL<sup>-1</sup>; ASM 0,2 mg mL<sup>-1</sup> e água estéril como testemunha. Os tratamentos foram adicionados ao meio BDA e homogeneizados. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e, em seguida, foi depositado, no centro de cada placa, um disco de micélio do fungo, com 0,6 cm de diâmetro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. As placas foram mantidas em BOD, a 25 °C. Avaliou-se o diâmetro das colônias a cada dois dias e calculou-se o índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) segundo Maguire (1962).

Com o objetivo de avaliar o efeito do óleo essencial de capim-limão no controle da pinta preta do tomateiro em casa de vegetação, sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram semeadas em vasos de 5 L, contendo substrato comercial composto por vermiculita expandida, material orgânico, macro e micronutrientes, como recomendado para a cultura. Foram avaliados o OECL, na concentração de 1.000 µL L<sup>-1</sup>, acrescido de leite em pó 1.000 µL L<sup>-1</sup>, acibenzolar-S-metil 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (padrão de indução de resistência), Recop<sup>®</sup> (84% de oxiclорido de cobre) 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (padrão de cobre) e leite em pó, a 1.000 µL L<sup>-1</sup> e testemunha. Os tomateiros foram pulverizados 23 dias após a semeadura (das) e inoculados sete dias depois (30 das). 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 uma nova câmara úmida, por mais 24 horas, para garantir a eficiência da inoculação.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições e parcela constituída de seis plantas. Foram realizadas cinco avaliações da severidade da pinta preta do tomateiro, a partir de quinze dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática de Boff et al. (1991). Posteriormente, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso

da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento, conforme a fórmula proposta por Shaner e Finney (1977) e a porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha.

Para avaliar as respostas bioquímicas de defesa induzidas em tomateiro pelo óleo essencial de capim-limão contra *A. solani*, foi realizado outro experimento, em casa de vegetação. Sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram semeadas em vasos de 3 L contendo substrato comercial composto por vermiculita expandida, material orgânico, macro e micronutrientes. Aos 15 dias de idade, as plantas foram pulverizadas com o óleo essencial de capim-limão a  $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ , acibenzolar-S-metil ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e água destilada. Parte das plantas foi inoculada com *A. solani*, quatro dias depois. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com três repetições e unidade experimental composta por um vaso contendo três plantas. As coletas das amostras foram realizadas  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4, 5, 6, 9 e 12 dias após a aplicação. As folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, tendo sido armazenadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , até o momento das análises.

Para o preparo do extrato proteico, aproximadamente 10 g de tecido foliar foram homogeneizados em almofariz com 3,0 mL 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  $13.000 \times g$  por 15 minutos e o sobrenadante, recuperado. Todos os passos foram executados a  $0 - 4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Este extrato foi utilizado para a quantificação das demais enzimas.

A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustada para 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, conforme método de Bradford (1976).

A atividade de quitinases (CHI) foi determinada pela adição de 70  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático à solução com 130  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e

60  $\mu\text{L}$  de CM-Chitin-RBV ( $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), substrato específico para quitinase fornecido por Loewe Biochemica GmbH, em microplacas de 96 cavidades, com capacidade de 350  $\mu\text{L}$ . Depois da incubação a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 80 minutos, as amostras foram acidificadas com 50  $\mu\text{L}$  de HCl 0,5 N, esfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas (1.450 g por 10 minutos). Alíquota de 210  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foi transferida para uma nova microplaca para leitura, a 492 nm, em um leitor EIA-compatível (WIRTH; WOLF, 1990).

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) foi medida seguindo método análogo ao da quitinase, apenas com a troca do substrato para CM-Curdlan-RBB ( $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e com o ajuste da alíquota do extrato enzimático para 100  $\mu\text{L}$  (deduzido o volume do tampão acetato, a fim de se ajustar o volume final em 310  $\mu\text{L}$  por cavidade). Para promover a ação hidrolítica da  $\beta$ -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 100 minutos. As amostras foram, então, medidas fotometricamente em filtro de 620 nm de um leitor EIA (WIRTH; WOLF, 1990).

A atividade de oxidases de polifenóis (PPO) foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático ajustado para 3,0 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,5 e pirocatecol a 25 mM. Após 10 minutos a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , foi medido o acréscimo da absorbância a 410 nm (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993). A atividade de PPO foi expressa pela variação de 1 OD<sub>410</sub> por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta 410 \text{ nm mg P}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ).

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático ajustado para 2,0 mL de uma solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. Após incubação a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 minutos, mediu-se a absorbância a 480 nm (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA,

1991). Uma unidade de POX foi expressa como a variação de 1 OD480 por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta 480 \text{ nm mg P}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ).

O conteúdo de lignina foi determinado pelo ensaio com ácido tioglicólico (TGA) (MONTIES, 1989), em que 0,2 g de tecidos 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 5,0 mL 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  $\mu\text{L}$  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 5,0 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  $\text{mL}^{-1}$ ) e os valores expressos em micrograma de lignina por miligrama de matéria fresca ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  MF).

A determinação colorimétrica de fenóis totais baseou-se no procedimento de Spanos e Wrolstad (1990), em que 100  $\mu\text{l}$  do extrato bruto foram adicionados a uma solução contendo 900  $\mu\text{l}$  de água destilada, 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 (v/v) e 4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 7,5 % (p/v). Os tubos foram, então, agitados e incubados, por 1 hora. A absorbância da solução foi medida em 765 nm e a quantificação foi baseada em uma curva padrão (100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg l}^{-1}$  de tirosina), preparada em seguida ao ensaio. Os valores foram convertidos e expressos em  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de matéria fresca (MF). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

Os dados foram submetidos à análise 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 Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

Os tratamentos a base de óleo essencial de capim-limão (OECL) e o fungicida Recop® (REC) apresentaram os menores índices de velocidade de crescimento micelial de *A. solani*, com reduções de 62,4% e 73,2%, respectivamente (Figura 1). O indutor acibenzolar-S-metil e o leite em pó não diferiram entre si e em relação ao controle (meio BDA somente com água destilada).

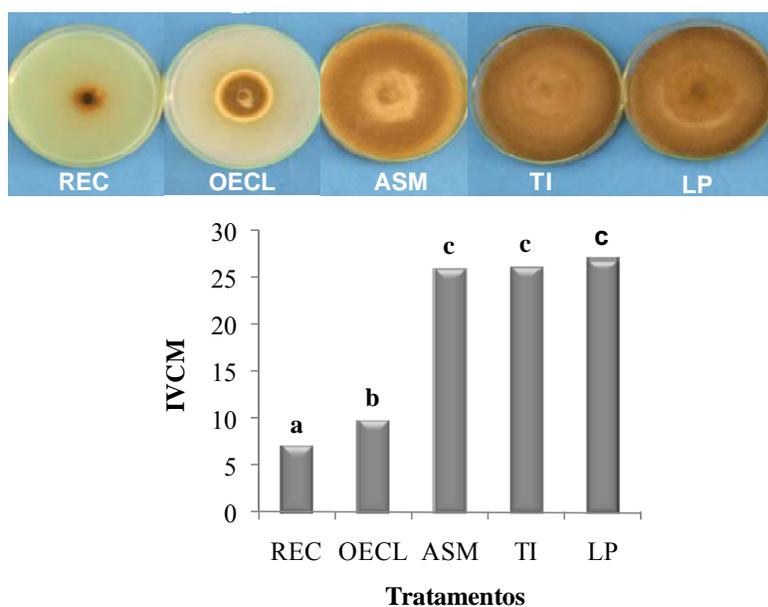


Figura 1 Índice de velocidade de crescimento micelial de *Alternaria solani* submetida ao óleo essencial de capim-limão (OECL, 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), Recop® (REC, 2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e acibenzolar-S-metil (ASM, 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), meio de cultura BDA (TI) e leite em pó (LP, 0,1%). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em condições de casa de vegetação, verificou-se que todos os tratamentos reduziram a severidade da pinta preta em tomateiro em relação à testemunha, exceto o leite em pó, o qual não diferiu do controle (Figura 2). O fungicida Recop<sup>®</sup>, o acibenzolar-S-metil e o óleo essencial de capim-limão não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram controles de 75,5%, 73,5% e 62,2%, respectivamente.

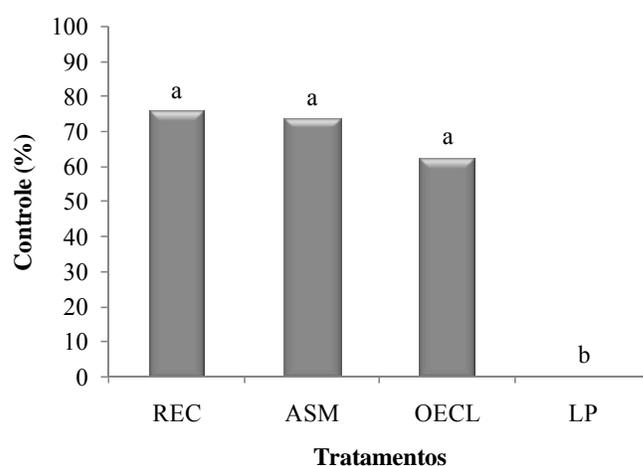


Figura 2 Percentual de controle da pinta preta do tomateiro mediante pulverização com o fungicida Recop<sup>®</sup> (REC, 2,0 mg mL<sup>-1</sup>), acibenzolar-S-metil (ASM, 0,2 mg mL<sup>-1</sup>), óleo essencial de capim-limão (CL, 1000 µL L<sup>-1</sup>) e leite em pó (LP, 0,1%). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Com relação aos teores de lignina e fenóis solúveis totais, não foi verificada diferença significativa entre plantas pulverizadas com os tratamentos e plantas testemunhas, aos 9 e aos 12 dias após a pulverização (dap) (Figura 3).

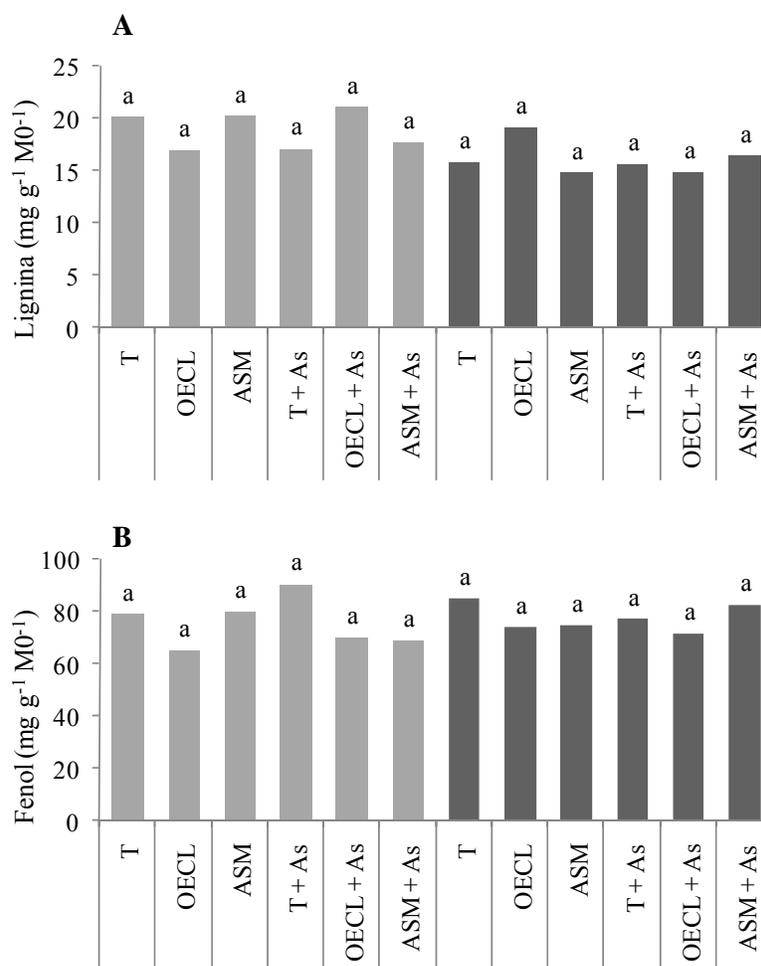


Figura 3 Teor de lignina (A) e fenóis solúveis totais (B) em folhas de tomateiro aos 9 e aos 12 dias após tratamento com: ASM - acibenzolar-S-metil e óleo essencial de capim-limão (OECL), comparados com a testemunha (T). Inoculação com *Alternaria solani* (As) ocorreu 4 dias após pulverização. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estisticamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Quanto às enzimas avaliadas, verificou-se aumento significativo na atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em plantas pulverizadas com o óleo essencial de capim-limão e acibenzolar-S-metil

(Figuras 4 e 5). Plantas pulverizadas somente com OECL e ASM, e plantas pulverizadas com OECL e ASM e inoculadas apresentaram aumento da atividade de peroxidases (POX), quando comparadas às plantas testemunhas, absoluta e inoculada, respectivamente. Tomateiros somente pulverizados com ASM apresentaram incrementos na atividade de POX aos 4, 6 e 9 dias após a pulverização (dap), tendo o pico da atividade enzimática ocorrido aos 9 dap, com 119,1% de aumento em relação à testemunha absoluta, enquanto plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com *A. solani* apresentaram atividade de POX superior à das plantas testemunhas inoculadas de 5 a 12 dap, sendo o pico aos 5 dap, com 164,0% de aumento em relação à testemunha inoculada (Figura 4A). Plantas pulverizadas somente com OECL apresentaram aumento na atividade de POX apenas aos 6 dap, com 66,5% de aumento enzimático em comparação ao controle (Figura 4B). Contudo, plantas pulverizadas com OECL e inoculadas apresentaram aumentos significativos na atividade de POX aos 12 dap, com 82,9% de aumento, quando comparadas à testemunha inoculada. Em relação à atividade de polifenoloxidasas (PPO), verificou-se que plantas de tomateiro somente pulverizadas com ASM apresentaram incremento significativo na atividade desta enzima aos 6 e aos 12 dap, enquanto plantas pulverizadas e inoculadas apresentaram picos de atividade de POX aos 12 dap (Figura 4C). A maior atividade enzimática de plantas pulverizadas com ASM inoculadas ou não ocorreu aos 12 dap, com 253,3% e 243,7% de aumento da atividade enzimática, respectivamente. Em relação a plantas de tomateiro tratadas com OECL inoculadas ou não, puderam-se observar picos de atividade de PPO aos 6 e aos 12 dap (Figura 4D), tendo a atividade máxima de plantas pulverizadas com OECL ocorrido aos 12 dap, com 355,4% de aumento e a de plantas pulverizadas com OECL e inoculadas aos 6 dap, com 256,0% de aumento.

Plantas pulverizadas com ASM apresentaram aumento da atividade de quitinases (CHI) aos 6, 9 e 12 dap e plantas pulverizadas com ASM e inoculadas não apresentaram diferença significativa da testemunha inoculada ao longo do período de coleta (Figura 5A). Plantas de tomateiro pulverizadas com OECL apresentaram aumento da atividade enzimática de 6 dap a 12 dap, tendo o pico da atividade de CHI ocorrido aos 12 dap com 97,7% de aumento em relação à testemunha absoluta. Entretanto, plantas pulverizadas e inoculadas apresentaram aumento significativo apenas aos 12 dap, com 29,5% de aumento da atividade em relação à testemunha inoculada (Figura 5B).

Plantas de tomateiro pulverizadas apenas com ASM tenderam a um aumento significativo na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU), de 6 dap a 12 dap, tendo o pico da atividade enzimática ocorrido aos 9 dap, com 87,4% de aumento em relação à testemunha absoluta (Figura 5C), enquanto plantas pulverizadas e inoculadas apresentaram aumento significativo na atividade de GLU apenas aos 12 dap, com 24,0% de aumento da atividade enzimática em relação à testemunha inoculada (Figura 5C). Plantas pulverizadas somente com OECL promoveram aumentos significativos na atividade de GLU aos 9 dap e aos 12 dap, tendo o pico da atividade enzimática ocorrido aos 12 dap, com 44,9% de aumento da atividade em relação à testemunha absoluta. Plantas pulverizadas com o óleo e inoculadas apresentaram atividade de GLU superior ao do controle inoculado somente aos 9 dap, com 28,7% de aumento (Figura 5D).

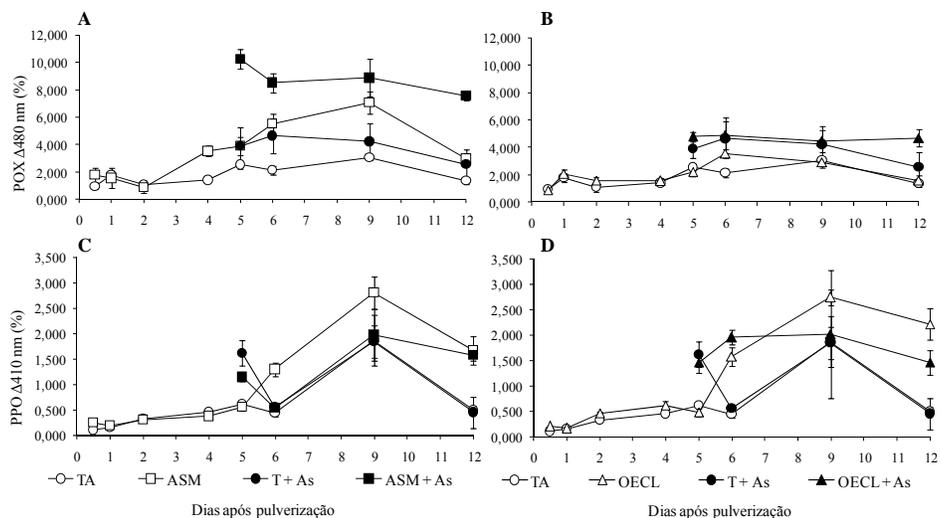


Figura 4 Atividade de POX (A e B) e PPO (C e D) em folhas de tomateiro após pulverização e inoculação com *Alternaria solani* (As) (quatro dias após pulverização). Acibenzolar-S-metil (ASM, 0,2 mg mL<sup>-1</sup>), óleo essencial de capim-limão (OECL, 1.000 µL L<sup>-1</sup>) e água destilada (T). Barras de erro representam o desvio padrão da média.

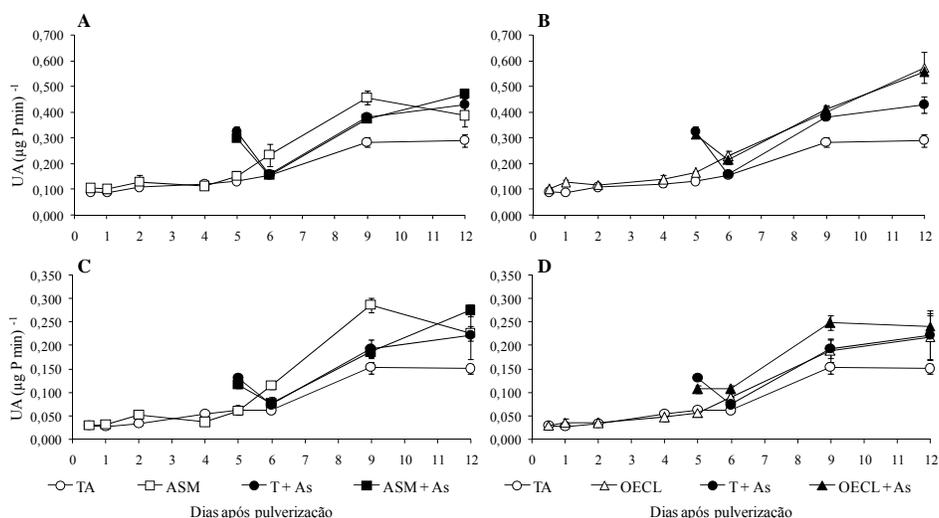


Figura 5 Atividade de CHI (A e B) e GLU (C e D) em folhas de tomateiro após pulverização e inoculação com *Alternaria solani* (As) (quatro dias após pulverização). Acibenzolar-S-metil (ASM, 0,2 mg mL<sup>-1</sup>), óleo essencial de capim-limão (OECL, 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ) e água destilada (T). Barras de erro representam o desvio padrão da média.

#### 4 DISCUSSÃO

Apenas o indutor acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2 mg mL<sup>-1</sup> não apresentou efeito direto sobre o crescimento micelial de *A. solani*. Kessmann et al. (1994) relataram que compostos químicos ou biológicos, para serem considerados indutores de resistência, não devem possuir atividade inibitória direta sobre o microrganismo patogênico. Entretanto, atualmente, há uma flexibilização neste conceito, pois vários outros compostos considerados indutores de resistência podem também apresentar ação direta sobre patógenos. Observou-se, nos ensaios em casa de vegetação, que OECL 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , ASM

0,2 mg mL<sup>-1</sup> e REC 2,0 mg mL<sup>-1</sup> promoveram redução no progresso da severidade da pinta preta em tomateiro.

O OECL e ASM aumentaram de forma significativa a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases, polifenoloxidasas e peroxidases em plantas de tomateiro, algumas vezes potencializada pela inoculação que, por si só, promoveu o aumento na atividade destas enzimas. O OECL promoveu aumento da atividade destas enzimas por vezes superior ao promovido por ASM, mostrando-se um indutor de resistência promissor para utilização em tomateiro.

Segundo Hammerschmidt e Smith-Becker (1999), o aumento da atividade de PRPs, associado à resistência expressa em plantas contra patógenos, é considerado um excelente marcador para a resposta de resistência. Segundo Silva, Pascholati e Bedendo (2007), a atividade de peroxidases implica em uma variedade de processos relacionados à defesa das plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação e suberização.

Em tomateiro, as peroxidases são uma das enzimas envolvidas no último passo na lignificação. O reforço da parede celular por lignina e compostos fenólicos é caracterizado como uma das reações desencadeadas pelo sistema de defesa de plantas, aumentando a resistência desta à degradação enzimática por patógenos e atuando como barreira mecânica ao ingresso de toxinas, bem como à penetração física e à restrição da colonização dos tecidos pelos patógenos (RESENDE et al., 2007). A participação de peroxidases na indução de resistência a *A. solani* foi descrita previamente por Capote et al. (2006), em que filtrados de *A. solani* foram testados em calos e folhas de três cultivares de tomateiro com diferentes níveis de resistência. Os autores observaram que os níveis mais altos da atividade de peroxidases foram observados na cultivar resistente, indicando que a atividade desta enzima está diretamente relacionada ao nível de resistência do tomateiro à *A. solani*.

Pereira et al. (2008) verificaram aumento da atividade de peroxidases em cafeeiro pulverizado com o óleo essencial de tomilho e desafiadas com *C. coffeicola*, aos 7 e aos 11 dias após a aplicação, comprovando a eficiência deste óleo no controle do patógeno. As polifenoloxidasas são enzimas que oxidam mono e o-difenóis em o-diquinonas (VAUGHN; LAX; DUKE, 1988), as quais possuem ação antimicrobiana (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002). Também participam do processo de lignificação durante a invasão do tecido pelo patógeno (LI; STEFFENS, 2002) e na geração de espécies reativas a oxigênio (RICHARD-FORGET; GAUILLARD, 1997; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004). Solorzano et al. (1996) sugeriram uma relação entre a atividade de PPO nos mecanismos de resistência do tomateiro frente a *A. solani*, ao detectar níveis mais altos de polifenoloxidasas em folhas inoculadas de variedade resistente (NCEBR-1) que nas susceptíveis (HC 3880 e Campbell 28).

Algumas hidrolases, como  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) e quitinases (CHI), estão envolvidas na resistência de plantas contra patógenos (JOOSTEN; WIT, 1989; KIM; HWANG, 1994; KINI; VASANTHI; SHETTY, 2000; RIVERA et al., 2002). Essas enzimas atuam diretamente degradando a parede celular de fungos ou interrompendo sua deposição, o que contribui para a morte do patógeno (MAUCH; MAUCH-MANI; BOLLER, 1988) e indiretamente pela liberação de fragmentos da parede celular que atuam como eliciadores de repostas de defesa da planta hospedeira, conhecidos como oligogalacturonídeos (YOSHIKAWA; YAMAOKA; TEKEUCHI, 1993).

Apesar de existirem poucos trabalhos realizados com o uso de óleos essenciais na ativação das respostas de defesa em tomateiro contra fungos, Lucas et al. (2012) verificaram o aumento da atividade de peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase, bem como a lignificação da parede celular em plantas de tomateiro pulverizadas com o óleo essencial de cravo-da-índia e desafiadas com *Xanthomonas vesicatoria*.

Com o avanço nas pesquisas sobre óleos essenciais e extratos vegetais de plantas medicinais, constata-se a existência de uma grande quantidade de compostos secundários nestas plantas, os quais podem ativar o sistema de defesa de diferentes plantas contra patógenos, tais como *C. coffeicola*, em cafeeiro (PEREIRA et al., 2008); *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. et Fr.), em pepino e *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*, em fumo (SCHNEIDER; ULLRICH, 1994); *Alternaria sesami*, em gergelim (GULERIA; KUMAR, 2006); *Drechslera graminea* (Rabenh. ex Schltdl.), em cevada (PAUL; SHARMA, 2002) e *Rhizoctonia solani* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), em arroz (KAGADE et al., 2004).

Diante dos resultados apresentados, verifica-se que o OECL é um produto promissor, principalmente em substituição ao uso de ASM e fungicidas à base de cobre, tanto para o manejo da pinta preta em sistema de cultivo convencional como orgânico, evitando a seleção de fitopatógenos resistentes a esses produtos. No entanto, fazem-se necessários maiores estudos sobre o intervalo e as doses de aplicação e a persistência destes produtos nas plantas.

## 5 CONCLUSÕES

O óleo essencial de capim-limão inibe o crescimento micelial de *Alternaria solani* e reduz parcialmente a severidade da pinta preta do tomateiro.

O óleo essencial de capim-limão e acibenzolar-S-metil promove o aumento significativo da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em plantas de tomateiro pulverizadas e inoculadas com *Alternaria solani*.

## REFERÊNCIAS

- BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: I., avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, maio/jun. 2006a.
- \_\_\_\_\_. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: II., avaliação in vivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 401-404, jul./ago. 2006b.
- BOFF, P. et al. Escalas para avaliação de severidade da mancha de estenfilio (*Stemphylium solani*) e da pinta preta (*Alternaria solani*) em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 280-283, out./dez. 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL PORTRAIT. **Óleos essenciais**. Disponível em: <<http://www.brasilportrait.com.br>>. Acesso em: 24 maio 2009.
- CAPOTE, A. et al. Effect of *Alternaria solani* crude filtrate on peroxidase activity and patterns in tomato leaves and callus tissues. **Revista de Protección Vegetal**, Habana, v. 21, n. 1, p. 37-42, 2006.
- CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 3, p. 262-265, 2003.
- DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, set. 2008.
- FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.
- GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 215, n. 1, p. 59-65, Jan. 1993.

GULERIA, S.; KUMAR, A. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against *Alternaria* leaf spot disease. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Isbanbul, v. 5, n. 1, p. 81-86, Jan. 2006.

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.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 5, p. 503-512, 2002.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.

JOOSTEN, M. H. A. J.; WIT, P. J. G. M. Identification on several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- $\beta$ -glucanases and chitinases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 89, n. 3, p. 945-951, Mar. 1989.

KAGADE, S. et al. Antimicrobial activity and induction of resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 1, p. 91-100, Jan./Feb. 2004.

KE-QIANG, C.; BRUGGEN, A. H. C. Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural**, Hebei, v. 4, n. 1, p. 108-116, 2001.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-59, 1994.

KIM, Y. J.; HWANG, B. K. Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinases isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 2, p. 195-209, 1994.

KINI, K. R.; VASANTHI, N. S.; SHETTY, H. S. Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase in seedlings of pearl millet in response to infection by *Sclerospora graminicola*.

**European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 3, p. 267-274, 2000.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 607-626.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 239-247, June 2002.

LUCAS, G. C. et al. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 94, n. 1, p. 45-51, Jan. 2012.

LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to immunize plants against infection. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 44, n. 3, p. 407-427, June 1995.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MANANDHAR, H. K. et al. Suppression of rice blast by pre-inoculation with avirulent *Pyricularia oryzae* and the nonrice pathogen *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 735-739, 1998.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II., inhibition of fungal growth by combination of chitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, n. 3, p. 936-942, Nov. 1988.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidases and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 162, n. 4, p. 491-498, Apr. 2002.

MONTIES, B. Lignins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic, 1989. p. 113-158.

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: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-454.

PAUL, P. K.; SHARMA, P. D. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 1, p. 3-13, Feb. 2002.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, Kent, v. 30, n. 2, p. 424-434, 2005.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, out. 2008.

\_\_\_\_\_. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 115-123, jan./fev. 2011.

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

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio/jun. 2007.

RICHARD-FORGET, F. C.; GAUILLARD, F. A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* cv. williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 7, p. 2472-2476, July 1997.

RIVERA, M. E. et al. Differential expression of  $\beta$ -1,3-glucanase susceptible and resistant melon cultivars in response to infection by *Sphaerotheca fusca*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 257-265, Nov. 2002.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with

various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, n. 4, p. 291-304, 1994.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Potencial de extrato e óleos essenciais de vegetais como indutores de resistência: plantas medicinais. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 10., 2003, São Pedro. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2003. p. 27-28.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 189-196, mar./abr. 2007.

SOLORZANO, E. et al. Inducción de isoenzimas de polifenoloxidasas y fenilalanina amonio liasas em hojas de tomate infectadas con *Alternaria solani*. **Revista de Protección Vegetal**, Habana, v. 11, n. 3, p. 153-157, sept./oct. 1996.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Easton, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STATS user's guide**. Version 8. Cary, 2001. Disponível em: <<http://www.sas.com/>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense down regulation of polyphenol oxidases results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 1, p. 105-117, Jan. 2004.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliça**. Viçosa, MG: UFV, 2000. p. 699-755.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidases: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 659-665, Mar. 1988.

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

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, Dec. 1990.

YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; TAKEUCHI, Y. Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 34, n. 8, p. 1163-1173, 1993.