

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA  
MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**

**2009**

**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA  
DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Eduardo Alves

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

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

Lucas, Gilvaine Ciavareli.

Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro  
/ Gilvaine Ciavareli Lucas. – Lavras : UFLA, 2009.  
93 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.  
Orientador: Eduardo Alves.  
Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. *Xanthomonas vesicatoria*. 3.  
Microscopia eletrônica de transmissão. 4. PR-proteínas. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.6429954

**GILVAINÉ CIAVARELI LUCAS**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DA MANCHA BACTERIANA  
DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,  
para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de julho de 2009

Prof. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Prof. Mário Sobral de Abreu

UFLA

Prof. Eduardo Alves  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,

pela vida, saúde e força para alcançar meus objetivos,

### **OFEREÇO**

Aos meus pais, Gilberto e Geni, e irmãos, Genilse e Genilson, pelo amor incondicional e apoio. Ao companheiro em todos os momentos Ricardo, pela paciência, incentivo e carinho.

### **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

À Fapemig, pelo apoio na manutenção dos aparelhos do LME.

Ao professor Eduardo Alves, pela confiança, orientação, paciência e amizade no desenvolvimento da dissertação.

Aos professores Ricardo Magela de Souza e Mario Lúcio Vilela de Resende, pela amizade, orientação, confiança e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca: professores Ricardo Magela de Souza e Mário Sobral de Abreu, pelas valiosas sugestões.

Aos docentes da Universidade Federal de Lavras que contribuíram para a minha formação, em especial aos do Departamento de Fitopatologia.

A minha família e aos meus colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), agradeço pelo apoio incondicional e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, pelo auxílio na execução dos trabalhos, especialmente a Ana Beatriz e a Ana Maria, pelos ensinamentos, carinho e amizade.

Aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia, pela convivência e contribuição à formação profissional e pessoal.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1: Óleos essenciais no manejo da mancha bacteriana do tomateiro.....	5
1 Introdução Geral.....	6
2 Referencial Teórico.....	8
2.1 A mancha bacteriana do tomateiro.....	8
2.2 Indução de resistência.....	10
2.3 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos.....	14
2.4 A microscopia aplicada no estudo de fungos e sua interação com plantas.....	17
3 Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2: Avaliação do efeito de óleos essenciais, épocas de aplicação e doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro.....	30
1 Resumo.....	31
2 Abstract.....	33
3 Introdução.....	35
4 Material e Métodos.....	36
4.1 Preparo das mudas de tomateiro.....	37
4.2 Origem, isolamento, preservação e inoculação de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	37
4.3 Obtenção dos óleos essenciais.....	38
4.4 Realização dos experimentos.....	38
4.4.1 Inibição <i>in vitro</i> do crescimento de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	38
4.4.2 Óleos essenciais e épocas de aplicação no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	39
4.4.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	40
4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) no estudo de células bacterianas de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> expostas a óleos essenciais.....	40
5 Resultados e Discussão.....	42
5.1 Inibição <i>in vitro</i> do crescimento de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	42
5.2 Óleos essenciais e épocas de aplicação no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	45
5.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.....	50

5.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) no estudo de células bacterianas de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> expostas a óleos essenciais	55
5.5 Considerações gerais	60
6 Conclusões.....	61
7 Referências Bibliográficas.....	62
CAPÍTULO 3: Óleo essencial de cravo-da-índia e acibenzolar-S-metil no controle da mancha bacteriana do tomateiro.....	69
1 Resumo .....	70
2 Abstract .....	71
3 Introdução.....	72
4 Material e Métodos.....	74
4.1 Obtenção do óleo essencial	74
4.2 Origem, preservação, isolamento e preparo da suspensão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	74
4.3 Realização dos experimentos	75
5 Resultados e Discussão.....	78
6 Conclusões.....	89
7 Referências Bibliográficas.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93

## RESUMO

LUCAS, Gilvaine Ciavareli. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

A mancha bacteriana, que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Xanthomonas* (Dowson), está entre as doenças mais importantes do tomateiro. É uma doença de difícil controle, sendo encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de tomate, sob condições de alta temperatura e umidade. As perdas causadas por esta doença resultam da redução da produtividade em decorrência direta dos sintomas, do custo dos produtos químicos utilizados como estratégia de controle e de sua aplicação às lavouras. Os princípios ativos que estão contidos nos produtos registrados no Brasil para o controle da mancha bacteriana são o cobre e os antibióticos estreptomicina e oxitetraciclina. No entanto, vários relatos demonstram a baixa eficácia da estreptomicina e dos produtos cúpricos, em lavouras de tomate. Assim os óleos essenciais surgem como uma alternativa para o controle da mancha bacteriana. Diante do exposto, este trabalho foi realizado com os objetivos de: (i) avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de canela (CA), citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR), tomilho (TO), eucalipto (EU) e árvore-de-chá (ME); (ii) avaliar o efeito destes óleos e das épocas de sua aplicação no controle da mancha bacteriana; (iii) avaliar a melhor dosagem dos óleos essenciais mais promissores sobre o controle da mancha bacteriana; (iv) avaliar o efeito direto destes sobre a célula bacteriana por meio do uso da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e (v) avaliar o potencial do óleo essencial de cravo-da-índia e do acibenzolar-S-metil na redução da mancha bacteriana e na ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa de plantas. A partir da concentração 1,0%, os óleos essenciais de TO, CR e CA promoveram inibição do crescimento de *X. vesicatoria in vitro* e, a 10,0%, todos os óleos essenciais estudados apresentaram este efeito. Em relação à interação entre épocas de aplicação e controle da doença, a aplicação de óleos essenciais somente uma vez antes da inoculação e semanalmente, antes e após a inoculação, apresentaram maior eficiência de controle. Os melhores tratamentos foram o ASM e os óleos essenciais de ME, CL, CR e CI. Os óleos essenciais de CI 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CL 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , ME 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e o ASM 0,2g  $\text{L}^{-1}$  foram eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados uma única vez 7 dias antes da inoculação. Os óleos essenciais de CI 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CL 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CR 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e ME 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  foram eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados semanalmente. Por meio da MET, observou-se que os óleos essenciais de ME, CR, CL e CI atuaram na parede celular de *Xanthomonas vesicatoria*, degradando-a e alterando a

densidade citoplasmática da célula bacteriana. O óleo essencial de CR e o acibenzolar-S-metil conferiram capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas vesicatoria*. Estes também promoveram o aumento da atividade das enzimas peroxidase, quitinase e glucanase, bem como a lignificação da parede celular.

---

\*Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (orientador), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

## ABSTRACT

LUCAS, Gilvaine Ciavareli. **Essential oils on control of tomato bacterial spot.** 2009. 93 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG\*.

The bacterial leaf has its etiological agent bacteria of the genus *Xanthomonas* (Dowson). It is among the most important diseases of tomato. The bacterial spot disease is difficult to control and it is found in almost all producing regions where the tomato grows under conditions of high temperature and humidity. The losses caused by this disease result from reduced productivity as a result of the direct symptoms, the cost of chemicals used as a strategy of control and its application to crops. The active ingredients that are contained in products registered in Brazil for the control of bacterial leaf spot are: the copper and the antibiotics streptomycin and oxytetracycline. However, several reports demonstrated the low effectiveness of streptomycin and copper products in the control of this disease of tomatoes. Thus the essential oils are an alternative to control of bacterial spot. Considering these aspects the goals of this study were: (i) evaluate the *in vitro* effect of essential oils of cinnamon (CA), citronella (CI), lemon grass (CL), Indian clove (CR), thyme (TO), eucalyptus (EU) and tea-tree (ME), (ii) evaluate the effect of these and their times of application in the control of bacterial spot, (iii) assess the best dose of essential oils to the control of spot bacteria, (iv) evaluate the direct effect of the bacterial cell through the use of transmission electron microscopy (TEM) and (v) evaluate the potential of essential oil of Indian clove and acibenzolar-S-methyl to reduce the bacterial spot and to activate biochemical responses of defense of plants. From the 1.0% concentration of essential oils TO, CR and CA promoted the inhibition of growth of *X. vesicatoria in vitro* and at 10.0% all the essential oils studied showed this effect. Regarding the interaction between time of application and control of disease, it was observed that essential oils applied only once before of inoculation and weekly, before and after inoculation showed higher efficiency of control. The best treatments were the ASM, and the essential oils of ME, CL, CR and CI. The essential oils of CI 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CL 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , ME, 1000 and 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$  and ASM 0.2  $\text{g L}^{-1}$  were effective against bacterial spot of tomato when applied once 7 days before of inoculation. The essential oils of CI 1000, 1500 and 2000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CL 1000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , CR 1000 and 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$  and ME in 1000 and 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$  were effective against tomato bacterial spot when applied weekly. By TEM was possible to observe that all essential oils used promoted degradation of cell wall and cytoplasmic and change in the density of bacterial cells. Similar alterations, however in greater intensity, occurred with the bacterial cells exposed to streptomycin sulphate. Others alterations observed, both in the bacteria exposed to essential oils and streptomycin sulphate, were the

loss of electro dense material inside the cell and the cellular extravasating. The Indian clove essential oil and acibenzolar-S-methyl were effective to confer partial protection in tomato plants challenged by *Xanthomonas vesicatoria*. They also promoted the increased activity of peroxidase, glucanase and chitinases, and the lignification of the cell wall.

---

\*Guidance Committee: Eduardo Alves – UFLA (Advisor), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

Óleos essenciais no manejo da mancha bacteriana do tomateiro

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro é uma planta originária da região andina e foi domesticado no México, sendo difundido por todo o mundo pelos portugueses e espanhóis. Ao chegar à Europa, o fruto foi associado a outro da mesma família das solanáceas, a mandrágora, extremamente venenosa e, por isso, foi rejeitado como alimento e aproveitado somente como ornamentação em jardins. Na Itália, por volta de 1554, 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 o incremento no consumo começaram a ocorrer apenas depois da primeira Guerra Mundial, por volta de 1930 (Alvarenga, 2004).

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), também conhecido no meio científico como *Solanum lycopersicum* L., é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil, que é de cerca de 3,36 milhões de toneladas por ano. A receita de sua comercialização gira em torno de 1,5 bilhões de reais e o cultivo, com 57 mil hectares, envolve, diretamente, mais de 200 mil pessoas na produção (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2008).

Segundo o Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola - Cepa (2008), na safra de 2007/2008, os estados que têm maior destaque como produtores foram Goiás, Minas Gerais e São Paulo, os quais, juntos, contribuíram com 57,5% da produção nacional e com 57,3% da área plantada.

A cultura destaca-se por apresentar um amplo histórico de problemas fitossanitários que são responsáveis por perdas significativas na produção. Dentre os principais problemas estão as doenças, entre as quais se destacam: a pinta-preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout (1896); a requeima, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary; a septoriose, causada por *Septoria lycopersici* Speg; as murchas, causadas por

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. Snyder & Hansen, *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth e *Ralstonia solanacearum*; o vírus do vira-cabeça do tomateiro, a podridão mole, causada por *Erwinia* spp.; o cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria*; a pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e as galhas, causadas por *Meloidogyne* spp.

De modo geral, as doenças do tomateiro são responsáveis por perdas significativas na produção e, para evitar este problema os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. Este, por sua vez, pode ser realizado de maneira abusiva e indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (Franzener et al., 2007).

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

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

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 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 com ação fungitóxica (Fiori et al., 2000; Bonaldo et al., 2004) ou bactericida ( Karaman et al., 2003; Kuhn et al., 2006; Vigo-Schultz et al., 2006) ou pela indução de respostas de defesa da planta, por meio de fitoalexinas, peroxidases e proteínas relacionadas à patogênese (Schwan-Estrada, 2003; Kagade et al., 2004), o que indica a presença de compostos com característica de eliciadores.

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

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A mancha bacteriana do tomateiro**

A mancha bacteriana, que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Xanthomonas* (Dowson) (Jones et al., 2000), está entre as doenças mais importantes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Trata-se de uma doença de difícil controle e é encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de tomate, sob condições de alta temperatura e umidade. Ela aparece como um fator na queda de rendimento da produção e na qualidade do fruto (Al-Dahmani et al., 2003), podendo provocar perdas superiores a 35% (Quezado-

Duval et al., 2003), limitando a produtividade de lavouras comerciais de tomateiro em todo o Brasil (Kimura & Carmo, 1996).

Toda a parte aérea da planta é suscetível à bactéria, que reduz o tamanho dos frutos, expondo-os à queimadura do sol, devido à queda das folhas e deprecia a qualidade do mesmo por causa do aparecimento de manchas. A doença também causa queda prematura de flores e frutos (Alvarenga, 2004; Lobo et al., 2005).

A taxonomia e a evolução entre os membros do gênero *Xanthomonas* associado ao tomate e ao pimentão (*Capsicum annuum* L.) têm sido objeto de discussão e controvérsia, desde a sua descrição, em 1921. Pesquisas sucessivas têm mostrado a existência de pelo menos dois grupos geneticamente diferentes pelas características fisiológicas, bioquímicas e de patogenicidade. Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), foram identificados três grupos, conforme as reações que provocam nas hospedeiras diferenciais: grupo tomate (XcvT), grupo pimentão (XcvP) e grupo tomate/pimentão (XcvTP) (Minsavage et al., 1990).

Dentro de cada grupo, existem raças fisiológicas, das quais T1, T2 e T3 pertencem ao grupo tomate (Minsavage et al., 1990; Jones et al., 1995). Utilizando diversos critérios Stall et al., (1994), dividiram a espécie em dois grupos: A e B. Em seguida, Vauterin et al. (1995), com base na hibridização DNA-DNA e nos modelos de utilização de carbono, dividiram Xcv em duas espécies: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A – raça T1) e *X. vesicatoria* (grupo B – raça T2), divisão esta não aceita por Schaad et al. (2000) e Young et al. (1996) propuseram a classificação de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, para o grupo A e *X. exitiosa* (Valterin et al., 1995), para o grupo B.

Após realizarem estudos incluindo testes de patogenicidade atividade enzimática, marcadores genéticos, hibridização DNA-DNA e comparação de sequências de RNA, Jones et al. (2000) concluíram que, dentro do grupo das

*Xanthomonas* patogênicas ao tomate e ao pimentão, existem quatro grupos fenotípicos distintos, os quais apresentam três espécies genéticas diferentes: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C), *X. vesicatoria* (grupo B – raça T2) e *X. gardneri* (ex Sutic 1957) (Jones et al., 2000) (grupo D).

As perdas causadas por esta doença resultam da redução da produtividade em decorrência direta dos sintomas, do custo dos produtos químicos utilizados como estratégia de controle e de sua aplicação nas lavouras. Os princípios ativos que estão contidos nos produtos registrados no Brasil para o controle da mancha bacteriana são o cobre e os antibióticos estreptomicina e oxitetraciclina (Lopes & Quezado-Soares, 1997). No entanto, vários relatos demonstram a baixa eficácia da estreptomicina e dos produtos cúpricos, em lavouras de tomate (Goode & Sasser, 1980; Maringoni et al., 1986). O aparecimento de isolados resistentes a esses princípios ativos é apontado pelos autores como a principal causa dessa baixa eficácia.

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

A resistência induzida (RI) ativa mecanismos de defesa representados por barreiras bioquímicas e ou estruturais, aumentando a resistência geral da planta (Oliveira et al., 1997). Esta resistência é expressa localmente no sítio de ataque do patógeno e sistemicamente em partes não infectadas da planta, dependendo do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno (desafiador) (Pascholati & Leite, 1995). A 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 et al., 1998).

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

A ativação das defesas naturais da planta por meio da RSA é uma das estratégias para o controle da mancha bacteriana (Louws et al., 2001), na 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 (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) que, muitas vezes, possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999) e é mediada por um processo dependente do ácido salicílico. Outros processos de defesa

podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (Durrant & Dong, 2004). Já na RSI, induzida por rizobactérias, a molécula sinalizadora é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno (Loon et al., 1998).

Dentre as PRPs, as quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases despertam interesse na interação plantas e fungos, pois as quitinases atuam hidrolisando a quitina, que é um polímero de  $\beta$ -1,4-N-acetil-glicosamina constituinte da parede celular de fungos (Chlan & Bourgeois, 2001) e apresenta ação antibacteriana, em razão, fundamentalmente, de sua ação lisozímica sobre a parede celular (Stintzi et al., 1993). As  $\beta$ -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 et al., 1997). Outras PR-proteínas muito estudadas são as peroxidases, cuja atividade é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas umas das principais funções destas enzimas (Cakmak & Horst, 1991). A oxidação de alcoóis hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina é catalisada por peroxidases, resultando na produção de radicais fenoxi-mesoméricos que reagem espontaneamente durante a deposição de lignina na parede celular, aumentando sua resistência (Peixoto, 1998).

O primeiro relato de indução de resistência foi descrito por Ray & Beauverie, em 1901, os quais obtiveram indução de resistência em begônia pelo uso de esporos atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. Quase trinta anos mais tarde, Carbonne & Kalaljev confirmaram esse estudo e mostraram que a resistência sistêmica adquirida depende da condição do hospedeiro. Em 1933, Chester observou que plantas susceptíveis podiam adquirir resistência após o primeiro contato com o patógeno avirulento ou após inoculação com forma atenuada do agente patogênico (Kessmann et al., 1994). A partir desses trabalhos pioneiros,

pesquisas com indução de resistência foram se multiplicando pelo mundo, com as mais diversas culturas (Sticher et al., 1997; Terry & Joyce, 2004; Bostock, 2005). No Brasil, os primeiros estudos foram desenvolvidos em 1970, no Instituto Biológico de São Paulo, pela Dra. Walkyria B.C. Moraes, contra *Hemileia vastatrix*, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis* e urediniósporos inativados de *H. vastatrix* (Bonaldo et al., 2005).

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

Cavalcanti et al. (2006), ao tratarem plantas de tomateiro com acibenzolar-S-metil (ASM), formulação biológica proveniente de biomassa cítrica (Ecolife<sup>®</sup>), suspensão de quitosana proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso* (MCp) e extrato aquoso de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectada por *Crinipellis pernicioso*, quatro dias antes da inoculação de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, obtiveram redução da mancha bacteriana em casa de vegetação. A resistência induzida em plantas tratadas com MCp, segundo os autores, pode ser evidenciada pelos altos picos de atividades das enzimas relacionadas com a defesa, tais como peroxidase, polifenoloxidase e quitinase, 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 da flora nativa, têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta

quanto pela indução de fitoalexinas e de outros compostos de defesa (Schwan-Estrada, 2003; Balbi-Peña et al., 2006).

### 2.3 Óleos essenciais no controle de fitopatógenos

Embora inúmeros estudos já tenham sido realizados, a composição química de 99,6% das plantas da flora brasileira, estimada entre 40 mil a 55 mil espécies, ainda é desconhecida (Ming 1996, citado por Silva et al., 2005). Com o avanço nas pesquisas sobre os óleos essenciais, constata-se a existência de uma grande quantidade de compostos secundários em plantas medicinais, tais como alcaloides, terpenos, flavonoides e esteroides. Estes compostos, cujas estruturas químicas já foram determinadas, ainda não tiveram suas atividades biológicas estudadas (Di Stasi 1996, citado por Silva et al., 2005).

Como exemplos, têm-se os controles da mancha-marrom (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker) em trigo, utilizando extrato aquoso de *Artemisia camphorata* Vill. (Franzener et al., 2003); do oídio (*Oidium lycopersici* Cooke & Masee) do tomateiro, pelo óleo emulsionável de *Azadirachta indica* A. Juss (Carneiro, 2003); da antracnose (*Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst.) em pepino, pelo extrato de *Eucalyptus citriodora* Hooker (Bonaldo et al., 2004) e do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) em alface, por *Zingiber officinale* Roscoe (Rodrigues, 2004).

Souza et al. (2004) controlaram *in vitro*, o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp., *Penicillium* spp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* utilizando óleos essenciais de canela (*Cinnamomum burnannil* Meissn), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Bonaldo et al. (1998) também comprovaram a atividade fungitóxica do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) contra *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* e *C. graminicola* em testes *in vitro*, nos quais a inibição do

crescimento micelial destes patógenos foi de 100%. Rios et al. (2003) utilizaram o óleo essencial de citronela *in vitro* para avaliar a percentagem de crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente da flor-preta-do-morangueiro, doença que pode causar grandes perdas na produção de morangos, e observaram que o óleo de citronela, nas concentrações de 5,0%, 10,0% e 15,0%, reduziu parcialmente o crescimento micelial de *C. acutatum*, enquanto na concentração de 20,0% ocorreu inibição total deste crescimento.

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) apresenta constituintes ativos reconhecidos cientificamente, como timol e carvacrol, tendo características similares a de bactericidas e fungicidas (Pinto et al., 2001). Em experimento utilizando óleo essencial de tomilho a  $800 \mu\text{L L}^{-1}$ , Zambonelli et al. (1996) observaram redução no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*, causando degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular. Almada et al. (1998) observaram a ação fungitóxica do mesmo óleo a 20% em plantas de pepino inoculadas com *Pseudoperonospora cubensis*, em casa de vegetação. Medice et al. (2007) observaram redução na severidade da ferrugem (*Phakopsora pachyrhizi*) em soja, variando de 34,59% a 62,29%, em plantas tratadas separadamente, sete dias antes da inoculação com óleo de eucalipto, citronela e tomilho 0,3%. Os autores observaram também o efeito direto do óleo de tomilho sobre a formação de urédias e uredinósporos, e que plantas tratadas apresentavam as folhas verdes e túrgidas, quando comparadas à testemunha somente inoculada, que se apresentava amarelada e em estágio avançado de senescência.

Outra observação do estudo por meio da microscopia eletrônica de varredura foi que plantas tratadas com óleo de tomilho 20% apresentavam urediniósporos murchos e em menor número, e as urédias eram menores, mostrando um efeito direto do óleo sobre o patógeno. Como verificado por Zambonelli et al. (1996), com outros fitopatógenos, o óleo de tomilho foi capaz

de causar degeneração das hifas e extravasamento do citoplasma celular. Medice et al. (2007) verificaram que óleo de citronela tem efeito sobre a germinação *in vitro* de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, entretanto, esse efeito não foi verificado em experimento em casa de vegetação.

Amaral et al. (2005), estudando o comportamento da essência do cravo-da-índia (*Sizygium aromaticum*) sobre crescimento fúngico em sementes de arroz, soja, milho e feijão, observaram que o óleo de cravo-da-índia apresentou ação fungicida nas concentrações de 0,5% a 0,1%, agindo possivelmente na parede celular do fungo.

Carriconde et al. (1996) comprovaram que o óleo essencial do *Cymbopogon citratus* tem como propriedade terapêutica a ação antifúngica e antibacteriana e seu principal componente é o citral. Onawunmi et al. (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*. Comparando os resultados dos constituintes isolados com os do óleo puro, constata-se que *E. coli* foi mais resistente do que no trabalho de Bertini et al. (2005).

Em trabalho realizado por Zambonelli et al. (1996), o óleo de árvore-de-chá apresentou efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* e *F. subglutinans*, nas doses de 0,2% a 10,0%, apresentando maior inibição nas concentrações mais altas. Amaral et al. (2005) demonstraram que o mesmo óleo essencial apresentou efeito sobre o crescimento micelial de *Penicillium* spp., a partir da concentração de 6,0%.

Como verificado nestes exemplos citados, é possível controlar fitopatógenos utilizando produtos naturais, os quais propiciam aos agricultores uma agricultura sustentável, de 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 à resistência da hospedeira ocorre em âmbito celular, 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, os microscópios de luz (ML) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições.

McLean & Byth (1980) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de urediniosporos de *P. pachyrhizi* em cultivares suscetíveis de soja resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todas as cultivares, não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo; houve diferença na percentagem de urediniosporos germinados, formação de apressório e penetração. As cultivares Tainung-3 e Tainung-4 apresentaram-se resistentes à germinação dos urediniosporos, portanto, a resistência dessas cultivares é de pré-penetração e penetração e a cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos urediniosporos, pois eles germinavam e penetravam no tecido do hospedeiro, mas não conseguiam desenvolver. Portanto, essa resistência ocorre na fase de pós-penetração.

Outro fator importante que pode levar à resistência das cultivares são as substâncias químicas e a topografia das folhas. Allen et al. (1991) utilizaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) para estudar estes fatores em 27 espécies de fungos ferruginosos, dentre estes *P. pachyrhizi*. Eles perceberam que, em locais da folha nos quais as diferenças no plano topográfico atingiam aproximadamente 0,4-0,8 $\mu$ m, o fungo desenvolvia muito bem e em locais de depressão, nos quais as diferenças eram inferiores ao número

acima, a formação de apressório era reduzida. Esses fatores estão diretamente ligados à orientação e ao crescimento do tubo germinativo. Bonde et al. (1976) e Koch et al. (1983) utilizaram a ML, MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nesta interação. Mais recentemente, Adendorff & Rijkenberg (2000) aplicaram a MEV no estudo do processo de infecção de outra espécie de *Phakopsora*, *P. apoda*, mostrando que o processo é bem semelhante aos de *P. pachyrhizi*.

Araújo et al. (2004) realizaram estudo 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*). Esses autores observaram, através da MEV, que ambos os genótipos comportaram-se de maneira semelhante nos processos de pré-penetração, penetração e pós-penetração. No entanto, nos processos de patogênese, na cultivar resistente houve um 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 possuem a capacidade de controlar doenças em plantas, mas o mecanismo pelo qual eles atuam ainda não é bem esclarecido. Pereira (2008), utilizando MEV em *Cercospora coffeicola*, observou que os conídios contidos em folhas de cafeeiro, tratados com óleos essenciais, apresentavam-se pouco germinados e, em alguns casos com extravasamento celular, além de apresentarem redução do crescimento das hifas. Medice et al. (2007), também utilizando MEV, porém, com o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, observaram que os conídios presentes em

folhas de soja tratadas com os óleos essenciais apresentavam-se murchos e atribuíram a este fato a possibilidade dos conídios estarem inviáveis. Estes trabalhos comprovaram o efeito dos óleos, mas não seu modo de ação.

Rasooli et al. (2006), por meio da microscopia eletrônica de transmissão, puderam comprovar o modo de ação desses óleos, pois observaram que os óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-porlock* provocaram danos severos às paredes, membranas e organelas celulares dos esporos de *A. niger* e que a exposição do micélio aos óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e *T. x-porlock* provocaram alterações morfológicas nas hifas, ruptura da membrana plasmática e destruição mitocondrial. Para bactérias humanas, sabe-se que os pesquisadores costumam utilizar observações de produção de ATP na célula, motilidade das bactérias e trocas catiônicas, porém, em se tratando de microscopia eletrônica, o único dado que se tem é o observado por Gustafson et al. (1998) que relataram que a perda de material eletro denso em bactérias expostas a óleo essencial de árvore-de-chá e observadas em microscopia eletrônica de transmissão indica a perda da parede celular.

Para fitobactérias, não foi encontrado nenhum trabalho a respeito e, dessa forma, não se tem conhecimento concreto do modo de ação desses óleos, o que leva à necessidade de estudos mais específicos e mais aprofundados.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from uredospores of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, Cambridge, v.104, n. 3, p. 317-324, Mar. 2000.

AL-DAHMANI, J. H.; ABBASI, P. A.; MILLER, S. A.; HOITINK, H. A. J. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 913-919, Aug. 2003.

ALLEN, E.; HAZEN, B.; HOCH, C.; KWON, Y.; LEINHOS, G. M. E.; STAPLES, R. C.; STUMPF, M. A.; TERHUNE, B. T. Apressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 3, p. 323-331, Mar. 1991.

ALMADA, C. B. J.; LIMA, C. Z. R. L. Z.; POSSAMAI, C. J. Controle alternativo do mildio (*Pseudoperonospora cubensis* Berk e 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.

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**, Goiás, v. 2, n. 2, p. 5-8, jul./dez. 2005. 1 CD-ROM.

ARAÚJO, J. C. A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 268-275, maio/jun. 2004.

BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. 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. 2006.

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

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. de L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M. de; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, p. 81-83, ago. 2005.

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

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, F. S. Inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e indução de fitoalexinas por *Eucalypto citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 229, ago. 1998. Suplemento.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 5, p. 290-294, May 1976.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 545-580, Sept. 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**, Conpenhagen, v. 83, n. 4, p. 463-468, Apr. 1991.

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

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, jul./set. 2003.

CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOZO JUNIOR, E. L. **Plantas medicinais e alimentícias**. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, 1996. v. 1, p. 45-47.

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

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. Tomate. **Informativo Afropecuário**, Florianópolis, dez. 2007. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acesso em: 13 nov. 2008.

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

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

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

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: UNIP, 1996. p. 109-127.

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

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, n. 7/8, p. 483-487, Aug. 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 2 fev. 2009.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 28, p. 29-38, jan./mar. 2007.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum: agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 503-507, abr. 2003.

GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention: the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 9, p. 831-834, Sept. 1980.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

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, 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.

INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.net/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam.shtm>>. Acesso em: 30 jul. 2008.

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

JONES, J. B.; STALL, R. E.; SCOTT, J. W.; SOMODI, G. C.; BOUZAR, H. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 4, p. 395-398, Apr. 1995.

KAGADE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. 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, v. 1, p. 91-100, Jan./Feb. 2004.

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

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

KIMURA, O.; CARMO, M. G. F. Doenças causadas por bactérias em pimentão. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 66-76, jan. 1996.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 109, p. 302-320, Jan. 1983.

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

LOBO, V. L. da S.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 343-349, jul./ago. 2005.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças**. Brasília: Embrapa, 1997. 70 p.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL H. L. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, May 2001.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V.; SILVA NETO, J. C. Controle químico da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye) do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 12, n. 1/2, p. 92-101, jun. 1986.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizis*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 31, n. 5, p. 951-956, Nov./Dec. 1980.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G. L. 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.

MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: UNIP, 1996. p. 69-86.

MINSAVAGE, G. V.; DALHLBECK, D.; WHALEN, M.; KEARNEY, B.; BONAS, U.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. Gene-for-gene relationship specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 3, n. 1, p. 41-47, Jan./Feb. 1990.

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

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

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.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. L.; SANTIAGO, E. J. A.; SILVA, F. G. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222 p.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associada à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 670-675, dez. 2003.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

RIOS, S. A.; CANUTO, R. S.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; SILVA, M. S.; SOUZA, L. T.; SANTOS, L. O.; SILVA, J. J. C.; NORMANHA, R. A.; PEREIRA, M. R.; DIAS, M. S. C. 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: SBF, 2003. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, E. **Atividade antimicrobiana *in vitro*, indução de peroxidase e controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em alface cultivado organicamente pelo uso de extrato de gengibre**. 2004. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

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

SCHAAD, N. M.; VIDAVER, A. K.; LACY, G. H.; RUDOLPH, K.; JONES, J. B. Evaluation of proposed amended names of several Pseudomonads and Xanthomonads and recommendations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 3, p. 208-213, Mar. 2000.

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, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro: ESALQ, 2003. p. 27-28.

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

SILVA, I. D. da; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R. da; CUNHA, M. G. da. 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, jul./dez. 2005.

SOUZA, S. M. C. de; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. 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.

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

STALL, R. E.; BEUALIEU, C.; EGEL, D.; HODGE, N. C.; LEITE, R. P.; MINSAVAGE, G. V.; BOUZAR, H.; JONES, J. B.; ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 44, n. 1, p. 47-53, Jan./Feb. 1994.

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

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

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

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

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

UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; MORRIS, S.; CHANDLER, D.; STEINER, H.; SPECKER, N.; HUNT, M.; LAWTON, K.; RYALS, J. 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.

LOON, L. C. V.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, Jan./Dec. 1998.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 45, n. 4, p. 472-489, July/Aug. 1995.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, out/dez 2006.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D. E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 75, n. 10, p. 721-763, Oct. 1996.

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

ZAMBONELLI, A.; D'AURELIO, A. Z.; BIANCHI, A.; ALBASIN, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 491-494, Mar. 1996.

## **CAPÍTULO 2**

Avaliação do efeito de óleos essenciais, épocas de aplicação e doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro.

## 1 RESUMO

A mancha bacteriana tem como agente etiológico bactérias do gênero *Xanthomonas* (Dowson) (Jones et al., 2000) e está entre as doenças mais importantes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Este trabalho foi realizado com os objetivos de: avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, citronela, capim-limão, eucalipto, árvore-de-chá e tomilho, suas épocas de aplicação e doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas vesicatoria*), além de avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela, árvore-de-chá e capim-limão na concentração de 0,1% e sulfato de estreptomicina (25mg mL<sup>-1</sup>) sobre *Xanthomonas vesicatoria*, por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação e um experimento *in vitro*, além da MET. No ensaio *in vitro*, os óleos essenciais foram utilizados nas dosagens: 0,1%, 1,0%, 10,0% e 100,0%. Foram utilizados também um padrão de cobre (Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>), leite em pó (LP-1%) como emulsificante para os tratamentos à base de óleo, sulfato de estreptomicina 25mg mL<sup>-1</sup> e água esterilizada, como testemunhas. No primeiro experimento em casa de vegetação, foram utilizados todos os óleos a 0,1%, acibenzolar-S-metil (ASM - 0,2 mg mL<sup>-1</sup>) e Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, em três épocas de aplicação. Como emulsificante, foi utilizado leite em pó a 1,0% e, como controle, as testemunhas inoculada e absoluta. As plantas foram tratadas somente antes da inoculação (A), somente após a inoculação (D) e antes e após a inoculação (AD), semanalmente, até o final do experimento. No segundo experimento em casa de vegetação, foi utilizada a melhor época de aplicação do primeiro experimento e os óleos essenciais mais promissores. Foram testadas três concentrações, 1.000, 1.500 e 2.000 µL L<sup>-1</sup>. A MET foi realizada segundo protocolo utilizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras. Foi observado, no teste *in vitro*, que os óleos de tomilho, cravo-da-índia e canela, a partir de 1%, promoveram inibição do crescimento de *X. vesicatoria*. A aplicação dos óleos essenciais somente uma vez antes da inoculação e semanalmente, antes e após a inoculação, proporcionou maior eficiência de controle. Os óleos essenciais de citronela 2.000 µL L<sup>-1</sup>, capim-limão 1.000 µL L<sup>-1</sup> e árvore-de-chá 1.000 e 1.500 µL L<sup>-1</sup> foram eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados somente aos 7 dias antes da inoculação; os óleos essenciais de citronela 1.000, 1.500 e 2.000 µL L<sup>-1</sup>, capim-limão 1.000 µL L<sup>-1</sup>, cravo-da-índia 1.000 e 1.500 µL L<sup>-1</sup> e árvore-de-chá 1.000 e 1.500 µL L<sup>-1</sup> foram eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados semanalmente. Por meio da MET foi possível observar que todos os óleos essenciais utilizados promoveram degradação da parede celular e alteração na densidade citoplasmática das células bacterianas. Fato semelhante, porém, em maior

intensidade, ocorreu com as células bacterianas expostas ao sulfato de estreptomicina. Outro fato observado foi a perda de material eletro denso, quando comparados os tratamentos à testemunha e o extravasamento celular, em células expostas aos óleos essenciais e ao sulfato de estreptomicina.

**Palavras-chave:** *Xanthomonas vesicatoria*, antibiograma, épocas de aplicação, doses, microscopia eletrônica de transmissão.

---

\*Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (orientador), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

## 2 ABSTRACT

The bacterial spot that has as etiologic agent bacteria of the genus *Xanthomonas* (Dowson) (Jones et al., 2000), it is among the most important diseases of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). The goals of this work were to evaluate the effect of essential oils of Indian clove, cinnamon, citronella, lemon grass, eucalyptus, tea tree, and thyme, their times and doses of application in the control of bacterial spot of the tomato (*Xanthomonas vesicatoria*), and evaluate the effect of essential oils from Indian clove, citronella, tea tree and lemon grass in a concentration of 0.1% and streptomycin sulphate (25 mg mL<sup>-1</sup>) on *X. vesicatoria* used the transmission electron microscopy (TEM). Three experiments were carried out. Two experiments were conducted in greenhouse, an experiment *in vitro* and the other for TEM. For the *in vitro* teste, the essential oils were used in doses of: 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0%. It was also used a standard copper fungicide (Recop<sup>®</sup> 2.0 mg mL<sup>-1</sup>), powder milk (LP-1%) as emulsifier for the oil-based treatments, streptomycin sulfate 25mg mL<sup>-1</sup> and sterile water, as controls. In the first experiment in a greenhouse, all oils were used at 0.1%, ASM (acibenzolar-S-methyl - 0.2 mg mL<sup>-1</sup>) and Recop<sup>®</sup> 2.0 mg mL<sup>-1</sup>, at three times of spreading. It was used as emulsifying powder milk to 1.0% and as control plants only inoculated and without inoculation. The plants were treated just before the inoculation (A), after inoculation (D) and before and after inoculation (AD) weekly until the end of the experiment. In the second experiment in a greenhouse it was used the best time of spreading from the first trial and the essential oils more promisory. Three concentrations were tested in 1000, 1500 and 2000 µL L<sup>-1</sup>. The TEM preparation and observation were performed using protocol used in the Laboratory of Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis at Federal University of Lavras - MG. It was observed in the *in vitro* conditions that the oils of thyme, Indian clove and cinnamon at 1% or more promoted inhibition of the growth of *X. vesicatoria*. The application of essential oils only once before to inoculation and weekly, before and after inoculation showed higher efficiency of control than only after inoculation. The essential oils of citronella 2000 µL L<sup>-1</sup>, lemon grass in 1000 µL L<sup>-1</sup>, tea-tree in 1000 and 1500 µL L<sup>-1</sup> were effective against bacterial spot of tomato when applied only 7 days before inoculation and the essential oils of citronella at 1000, 1500 and 2000 µL L<sup>-1</sup>, lemon grass at 1000 µL L<sup>-1</sup>, clove at 1000 and 1500 µL L<sup>-1</sup> and tea-tree at 1000 and 1500 µL L<sup>-1</sup> were effective against the bacterium of the tomato when applied weekly. By TEM was possible to observe that all essential oils used promoted degradation of cell wall and cytoplasmic and change in the density of bacterial cells. Similar alterations, however in greater intensity, occurred with the bacterial cells exposed to streptomycin sulphate.

Others alterations observed, both in the bacteria exposed to essential oils and streptomycin sulphate, were the loss of electro dense material inside the cell and the cellular extravasating.

**Key words:** *Xanthomonas vesicatoria*, antibiogram, time of application, doses, transmission electron microscopy.

---

\*Guidance Committee: Eduardo Alves – UFLA (Advisor), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é a hortaliça com maior volume de comercialização no Brasil, cerca de 3,36 milhões de toneladas por ano.

A cultura destaca-se por apresentar amplo histórico de problemas fitossanitários que são responsáveis por perdas significativas na produção. Dentre as principais doenças da cultura, está a mancha bacteriana, que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Xanthomonas* (Dowson) (Jones et al., 2000). Toda a parte aérea da planta é suscetível à bactéria, que reduz o tamanho dos frutos, expondo-os à queimadura do sol devido à queda das folhas e deprecia a qualidade do mesmo por causa do aparecimento de manchas. A doença também causa queda prematura de flores e frutos (Lobo et al., 2005). Para evitar perdas significativas na produção, os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. Este, por sua vez, pode ser realizado de maneira abusiva e indiscriminada, gerando poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (Franzener et al., 2007).

Neste contexto, a agricultura alternativa busca medidas de controle de doenças que minimizem o impacto ao ambiente e ao homem (Zadoks, 1992).

Os óleos de plantas medicinais têm em sua composição substâncias do metabolismo secundário, as quais podem exercer funções importantes na interação planta-patógeno. Os óleos 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 com ação fungitóxica (Bonaldo et al., 2004) ou bactericida (Vigo-Schultz et al., 2006).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) aparece neste contexto como importante ferramenta para a elucidação do modo de ação dos óleos

essenciais de plantas medicinais sobre *Xanthomonas vesicatoria*, pois pouco se sabe sobre o efeito deles em bactérias.

Rasooli et al. (2006), por meio da MET, verificaram que esporos de *Aspergillus niger* expostos aos óleos essenciais de *T. eriocalyx* e *T. x-porlock* apresentaram danos severos nas paredes, membranas e organelas celulares e que exposições do micélio do fungo a estes óleos provocaram alterações morfológicas nas hifas, ruptura da membrana plasmática e destruição mitocondrial. Gustafson et al. (1998) relataram que a perda de material eletrodense em bactérias expostas ao óleo essencial de árvore-de-chá indica a degradação da parede celular, a qual pode ser observada em MET.

A determinação da atividade biológica dos compostos presentes nos óleos essenciais, em relação à sua atividade eliciadora ou antimicrobiana, e sua atividade sobre a ultraestrutura de fitobactérias podem contribuir para a aquisição de conhecimentos que reforcem sua possível utilização como medida alternativa de controle para doenças de plantas.

Diante do exposto, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos óleos essenciais, as épocas de aplicação e as dosagens sobre o progresso da mancha bacteriana no tomateiro, bem como avaliar o efeito ultraestrutural dos óleos essenciais mais promissores sobre *Xanthomonas vesicatoria*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) e em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia (DFP), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, a 960 m de altitude, nas coordenadas 44,97° de

longitude oeste e 21,22° de latitude sul. O período do experimento foi de janeiro a dezembro de 2008.

#### **4.1 Preparo das mudas de tomateiro**

Foram utilizadas mudas de tomateiro da cultivar Santa Cruz Kada suscetível a *Xanthomonas vesicatoria*. As mudas foram provenientes de semeadura em bandejas com 128 células, em substrato comercial Plantmax® HT. Quinze dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos de 5 kg contendo o mesmo substrato comercial utilizado anteriormente. Em cada vaso foram transplantadas três mudas de tomateiro, as quais, por sua vez, foram mantidas em condições de casa de vegetação, na UFLA, durante todo o período experimental, onde receberam os tratamentos culturais necessários até o final dos testes e avaliações.

#### **4.2 Origem, isolamento, preservação e inoculação de *Xanthomonas vesicatoria***

Foi utilizado, neste trabalho, o isolado 89T de *Xanthomonas vesicatoria* cedido pela Embrapa Hortaliças, no Distrito Federal. A bactéria foi preservada em peptona glicerol no *deep freezer* e também inoculada em plantas de tomateiro, para verificar seu potencial de virulência. Folhas sintomáticas dessas plantas foram utilizadas como fonte de inóculo.

O isolamento da bactéria foi feito a partir das folhas previamente infectadas, em meio 523 de Kado & HesKett (1970) (MB1), pela técnica de estrias paralelas. Posteriormente, a bactéria foi cultivada no mesmo meio, a 28°C, durante 24 horas, para o preparo das suspensões para inoculação. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para  $A_{600} = 0,30$ , correspondendo a, aproximadamente,  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

A inoculação foi realizada em plantas de tomate previamente expostas a

câmara úmida por um período de 24 horas, via pulverização foliar, até o ponto de escorrimento e, posteriormente, foi realizada nova câmara úmida, por mais um período de 24 horas, para garantir a eficiência da inoculação.

### **4.3 Obtenção dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais utilizados foram adquiridos da Brasil Portrait (2008).

### **4.4 Realização dos experimentos**

#### **4.4.1 Inibição *in vitro* do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria***

O experimento *in vitro* de inibição do crescimento de *X. vesicatoria* foi realizado com óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (Linne) Merril), eucalipto (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.), árvore-de-chá (*Melaleuca alternifolia* Cheel) e capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)), nas concentrações de 0,1%, 1,0%, 10,0% e 100,0%; padrão de cobre (Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>), leite em pó (LP-1%) como emulsificante para os tratamentos à base de óleo, sulfato de estreptomicina 25mg mL<sup>-1</sup> e água esterilizada, como testemunhas. Com o objetivo de examinar o potencial de inibição direta dos óleos essenciais de plantas medicinais sobre a bactéria, o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Discos de papel de filtro autoclavados de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 20 µL de cada substância testada, secos à temperatura ambiente e colocados em placas de Petri com meio 523 de Kado & HesKett (1970) contendo 100 µL da suspensão de *X. vesicatoria*. A presença e o diâmetro de halos de inibição foram avaliados 48 horas depois da incubação em câmara de crescimento, ajustada para 28°C.

#### **4.4.2 Óleos essenciais e épocas de aplicação no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação**

Utilizaram-se, neste experimento, óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia, eucalipto, canela, citronela, árvore-de-chá e capim-limão, na concentração de 0,1%. Para todos os tratamentos à base de óleo, foi utilizado leite em pó (LP-1,0%) como emulsificante. Foram utilizados, ainda, dois tratamentos adicionais, um como padrão de indução de resistência (acibenzolar-S-metil 0,2 mg mL<sup>-1</sup>) e outro como padrão de cobre (Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>), além das testemunhas inoculada, absoluta e leite em pó.

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

Foram realizadas cinco avaliações para se determinar severidade e a eficiência dos tratamentos, utilizando-se a escala de Mello et al. (1997), na qual cinco níveis de infecção são utilizados para compor os seus diagramas representativos (1%, 5%, 15%, 25% e 50%).

Foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento, conforme a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977) e a eficiência dos tratamentos.

#### **4.4.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação**

O experimento foi realizado no intuito de avaliar em qual concentração os óleos essenciais mais promissores do experimento anterior se tornam mais eficientes na redução do progresso da mancha bacteriana em casa de vegetação. Foram utilizados os óleos essenciais de citronela, capim-limão, cravo-da-índia e árvore-de-chá e as duas melhores épocas de aplicação (A e AD), obtidas no experimento anterior, o leite em pó como emulsificante a 1%, o tratamento padrão de indução de resistência (ASM 0,2 mg mL<sup>-1</sup>), o padrão de cobre (Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>) e uma testemunha inoculada. Foram utilizadas quatro concentrações dos óleos mais promissores: 2.000 µL L<sup>-1</sup>, 1.500 µL L<sup>-1</sup>, 1.000 µL L<sup>-1</sup> e 0 µL L<sup>-1</sup>. A metodologia de aplicação foi a mesma do experimento anterior.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC), com três repetições e parcela constituída de três plantas. Foram realizadas cinco avaliações, para se determinar a severidade e a eficácia dos tratamentos. Foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento e a eficiência dos tratamentos.

#### **4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) no estudo de células bacterianas de *Xanthomonas vesicatoria* expostas a óleos essenciais**

Foram utilizados os óleos essenciais de citronela, capim-limão, cravo-da-índia e árvore-de-chá a 0,1%; leite em pó (LP- 1%) como emulsificante para os tratamentos à base de óleo; sulfato de estreptomicina (25mg mL<sup>-1</sup>) como tratamento padrão e testemunha.

Uma colônia do isolado de *Xanthomonas vesicatoria* foi repicada em meio Kado & Heskett (1970) (MB1), por meio da técnica de estrias paralelas e

cultivada, a 28°C, durante 24 horas. Posteriormente, esta placa foi raspada com auxílio de uma alça de platina para a retirada das células bacterianas e estas, por sua vez, foram adicionadas a um erlenmaier contendo 200 mL de MB1 líquido, que foi levado a uma incubadora com mesa orbital giratória, à temperatura de 28°C, por 40 horas.

Após as 40 horas, 20 mL do meio líquido contendo a bactéria foram transferidos para erlenmaiers contendo 200 mL de MB1 líquido. Novamente, os erlenmaiers foram levados para a incubadora com mesa orbital giratória, à temperatura de 28°C, por um período de 24 horas.

O leite em pó foi preparado com água destilada na concentração citada anteriormente e autoclavado por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, foram adicionados 225µL dos óleos essenciais em 5 mL do leite em pó preparado. Esta solução foi agitada em vortex por 10 segundos e adicionada aos erlenmaiers contendo o MB1 líquido e a bactéria cultivada por 24 horas (200 mL + 20 mL, repectivamente). A solução foi agitada e levada novamente à incubadora, por 24 horas. Posteriormente, alíquotas desta solução foram colocadas em eppendorfs de 2,0 mL e pré-fixadas em fixador Karnovsky, por 24 horas, e posteriormente centrifugadas, por 5 minutos, a 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Foi adicionado, então, um gel de agarose a 1,0%. Dessa forma, foi possível retirar o pellet da bactéria dos eppendorfs, pois estes ficaram aderidos ao gel. Esses fragmentos foram transferidos para uma solução tampão de cacodilato 0,05M, lavados três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1,0%, em água, por 1 hora. Posteriormente, esses fragmentos foram lavados por duas vezes em água destilada por 15 minutos, transferidos para solução de acetato de uranila a 0,5%, durante 12 horas, a 4°C e, em seguida, lavados novamente em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% uma vez e 100% por três vezes). A seguir, o material foi incluído em gradiente crescente de Spurr/acetona 30% (8 horas), 70% (12 horas)

e 100% duas vezes, por 24 horas cada, sendo os espécimes montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa, a 70°C, por 48 horas. Finalmente, foram realizados os cortes no material no ultramicrotomo.

Para a ultramicrotomia, os blocos obtidos foram levados a um aparelho de “trimming” para a retirada dos excessos. Em seguida, secções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (<100 nm) foram cortadas, utilizando-se um ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut), com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina (1,0 g de azul de toluidina, 1,0 g de borato de sódio e 100 mL de água), filtrados em membrana de celulose 0,22 µm e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro (*golden slot grids*) e secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975). As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por três minutos cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, a 80kv.

As imagens foram geradas e registradas digitalmente, havendo diversas imagens para cada amostra nas condições de trabalho de 20Kv e distância de 9mm. As imagens geradas foram gravadas e abertas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 13.

Este experimento foi repetido duas vezes, para a confirmação dos resultados.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Inibição *in vitro* do crescimento de *Xanthomonas vesicatoria***

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela, capim-limão, canela,

eucalipto, árvore-de-chá e tomilho não foram tóxicos a *X. vesicatoria* na concentração de 0,1%. Na concentração de 1,0%, os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e canela foram tóxicos ao crescimento da bactéria e, a partir de 10,0%, todos os óleos essenciais promoveram halos de inibição do crescimento da bactéria (Tabela 1).

TABELA 1 Inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria* submetida a diferentes concentrações dos óleos essenciais: tomilho, cravo-da-índia, eucalipto, canela, citronela, árvore-de-chá e capim-limão; ao leite em pó e água estéril e aos padrões: Recop<sup>®</sup>, sulfato de estreptomicina.

<b>Óleos essenciais</b>	<b>0,1%</b>	<b>1,0%</b>	<b>10,0%</b>	<b>100,0%</b>
Tomilho	-	+	+	+
Cravo-da-índia	-	+	+	+
Eucalipto	-	-	+	+
Canela	-	+	+	+
Citronela	-	-	+	+
Árvore-de-chá	-	-	+	+
Capim-limão	-	-	+	+
<b>Padrões e testemunhas</b>				
Leite em pó (1,0mg mL <sup>-1</sup> )				-
Recop <sup>®</sup> (2,0mg mL <sup>-1</sup> )				-
Sulfato de estreptomicina (25,0mg mL <sup>-1</sup> )				+
Água estéril				-
+ presença de halo de inibição		- ausência de halo de inibição		

A atividade antimicrobiana *in vitro* de substâncias obtidas a partir de plantas medicinais vem sendo comprovada por diversos autores, principalmente para fungos. Vários resultados corroboram os obtidos no presente trabalho. Ponce et al. (2003) verificaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia sobre o crescimento de bactérias, na concentração de 500 µL L<sup>-1</sup>, pelo método mínimo de concentração. Os mesmos autores também verificaram o

poder antimicrobiano do óleo essencial de árvore-de-chá, quando utilizado na concentração de 500  $\mu\text{L L}^{-1}$  sobre o crescimento de bactérias pelo método mínimo de concentração. Compostos como terpinen-4-ol, presentes em grande concentração no óleo de árvore-de-chá, são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas (Bullerman et al., 1977; Vieira et al., 2004).

Souza et al. (2004) avaliaram o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e canela sobre o desenvolvimento micelial de *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* e verificaram que o óleo essencial de canela inibiu completamente o desenvolvimento micelial destes na concentração de 200  $\mu\text{L L}^{-1}$ , enquanto os óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho apresentaram tal inibição nas concentrações de 600  $\mu\text{L L}^{-1}$ .

Alves et al. (2003) relataram a eficiência dos óleos essenciais de citronela e capim-limão no controle dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, *Colletotrichum musae* Berk e Curt. e *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zam. & Gilb. Já Santos et al. (2001) relataram a eficiência do óleo essencial de citronela sobre a inibição do desenvolvimento micelial de *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, causador da fusariose do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

Medice et al. (2007) verificaram também que o óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora* Hill & Johnson) inibiu totalmente a germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. e reduziu a severidade da ferrugem-asiática da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), em casa de vegetação. Em outro trabalho, Salgado et al. (2003) relatam o efeito fungistático do óleo essencial de eucalipto sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker e *Botrytis cinerea* Pers., na concentração de 500  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Segundo Charles & Simon (1990), os óleos essenciais de eucalipto são constituídos, de forma geral, de terpenos complexos, como o citronelal e o cineol.

De acordo com dados existentes na literatura, sabe-se que os óleos essenciais de plantas medicinais podem apresentar ação tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos (Prashar et al., 2003), incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (Carson et al, 1995; Carson & Riley, 1995). Porém, a maioria desses trabalhos relata a eficiência dos óleos essenciais em bactérias humanas. Poucos são os relatos em fitobactérias, sendo, portanto, este trabalho um dos primeiros a fazê-lo.

## **5.2 Óleos essenciais e épocas de aplicação no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação**

Foi observada interação significativa para a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPSD) da mancha bacteriana do tomateiro, entre as épocas de aplicação e os produtos utilizados. Nenhuma planta apresentou efeito de fitotoxidez devido à aplicação dos tratamentos.

Em plantas tratadas somente antes da inoculação (A), o acibenzolar-S-metil (ASM) foi o tratamento mais eficiente no controle do progresso da mancha bacteriana em tomateiro, com controle de 89,0%, seguido pelos óleos de árvore-de-chá (ME), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR), citronela (CI), canela (CA) e tomilho (TO), com controles de 60,0%, 57,0%, 53,0%, 51,0%, 49,0% e 44,0%, respectivamente. O óleo essencial de eucalipto (EU) e o fungicida Recop<sup>®</sup> demonstraram eficiência no controle de 37,0% e 26,0%, respectivamente, igualando-se estatisticamente à testemunha com leite em pó (30,0%) (Figura 1A).

Em plantas tratadas semanalmente, antes e após a inoculação (AD), o ASM foi também o tratamento mais eficiente no controle do progresso da doença, com 89,0% de eficiência, seguido dos óleos essenciais TO (64,0%), CL (61,0%), CR (53,0%), CI (49,0%), ME (47,0%) e o fungicida (48,0%). Os óleos

essenciais de canela (27,0%) e eucalipto (25,0%) demonstraram menor eficiência, igualando-se estatisticamente à testemunha leite em pó (13,0%) (Figura 1B).

Em plantas tratadas somente uma vez após a inoculação (D), o fungicida e os óleos essenciais de eucalipto, citronela, árvore-de-chá, capim-limão e tomilho foram os melhores tratamentos para o controle da doença, com eficiência de 53,0%, 50,0%, 45,0%, 42,0%, 39,0% e 29,0%, respectivamente. Eficiência reduzida foi observada pela aplicação do óleo essencial de canela (21,0%). O ASM e o óleo essencial de cravo-da-índia não apresentaram eficiência de controle (Figura 1C).

Em relação à interação entre épocas de aplicação e controle da doença, a aplicação em A e AD apresentaram maior eficiência de controle e em ambas o melhor tratamento foi o ASM, seguido dos óleos de ME, CL, CR e CI. Provavelmente, A e AD destacaram-se como as melhores épocas de aplicação dos tratamentos, devido à alta eficiência do ASM.

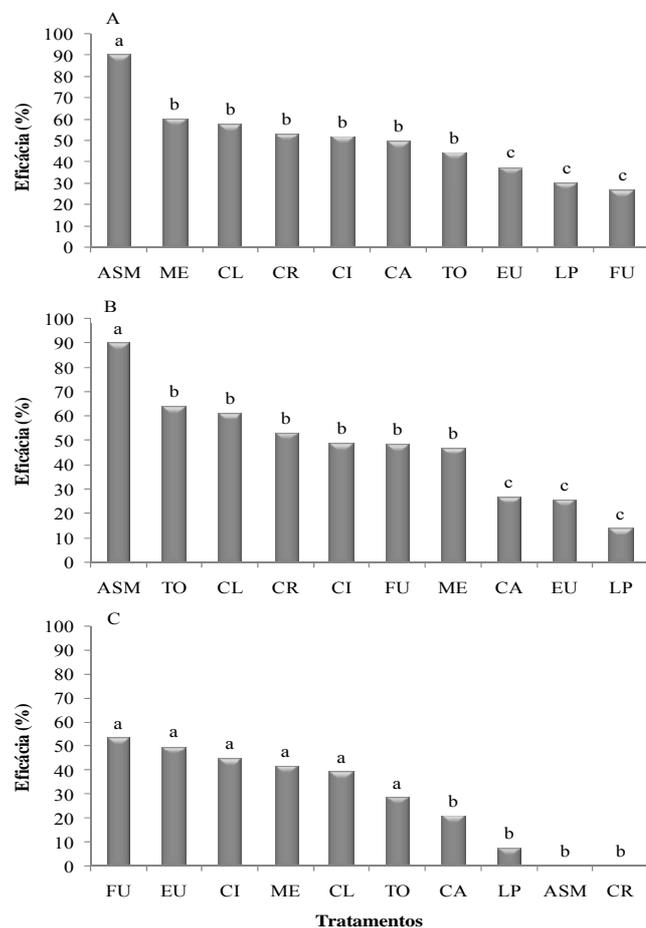


FIGURA 1 Eficácia dos óleos essenciais sobre o progresso da mancha bacteriana do tomateiro em três diferentes épocas de aplicação. Canela (CA), citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR), eucalipto (EU), árvore-de-chá (ME) e tomilho (TO), Bion<sup>®</sup> (ASM), Recop<sup>®</sup> (FU) e leite em pó (LP). 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 ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados do presente trabalho demonstram que os óleos essenciais de plantas medicinais estudados possuem características muito mais próximas a produtos com ação curativa do que indutora. Apenas o óleo essencial de cravo-da-índia, dentre os óleos estudados, apresentou características similares às do indutor padrão utilizado para o tomateiro (ASM). Isso porque, quando aplicado no tomateiro antes da inoculação com *Xanthomonas vesicatoria* reduziu a severidade da doença em 53,0% e quando aplicado somente após a inoculação do patógeno, não houve redução da severidade da doença, semelhante ao observado com o ASM.

Os resultados obtidos neste trabalho foram mais promissores que os obtidos por Cavalcanti et al. (2006) que, utilizando Bion<sup>®</sup> (0,2g L<sup>-1</sup>), observaram apenas 47,7% de controle de *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro, enquanto o controle observado neste trabalho foi de 89,0%. Tal eficiência foi observada por Guzzo et al. (2001) que obtiveram proteção local de 66,0% a 97,0% e sistêmica de 83,0% a 94,0% contra a ferrugem do cafeeiro.

Abreu (2006) observou reduções de 26,0%, 62,0% e 95,0% na incidência da pinta-preta do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L), em plantas tratadas com o óleo essencial de canela, nas concentrações de 500, 750 e 5.000 µL L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em campo, observou redução de 12,5% e 32,8% na incidência da doença em folíolos de plantas de tomateiro tratadas com óleo essencial de canela, nas concentrações de 3.000 e 5.000 µL L<sup>-1</sup>. Segundo Abreu (2006), o aumento das concentrações do óleo essencial de canela e a diminuição dos intervalos de aplicação proporcionam um aumento na eficiência do óleo no controle da doença. Entretanto, no presente trabalho, observou-se que o óleo essencial de canela, aplicado apenas uma vez na cultura antes da inoculação, promoveu proteção de 49,0%; aplicado somente uma vez após a inoculação, promoveu proteção de 21,0% e, quando aplicado semanalmente, durante todo o cultivo, promoveu proteção da cultura em 27,0%, indicando que a diminuição

dos intervalos de aplicação não aumentou a eficiência do óleo essencial de canela no controle da doença.

A eficiência de controle dos óleos utilizados neste trabalho é reforçada pelos resultados relatados por alguns autores em outros patossistemas. Medice et al. (2007) observaram reduções de 35,0% a 62,0% na severidade da ferrugem-asiática da soja, nas cultivares Conquista e Suprema tratadas com os óleos essenciais de tomilho (0,3%), citronela (0,5%), eucalipto (1,0%) e nim (1,0%), sete dias antes da inoculação. Já neste trabalho, a redução na severidade da doença para estes mesmos óleos, exceto o nim, foi de 37,0% a 51,0%. Medice (2007), em experimento realizado em campo e Pereira (2008), em experimento realizado em casa de vegetação, testaram diferentes óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja e da ferrugem do cafeeiro, respectivamente, e obtiveram resultados semelhantes aos observados neste trabalho. Os óleos essenciais de árvore-de-chá, eucalipto e citronela promoveram controles da doença semelhantes ao fungicida, sem diferirem entre si.

Perina (2008) observou redução de 68,7% na severidade de oídio da soja com a utilização do óleo essencial de capim-limão. Nas mesmas condições de tratamento, observou-se, no presente trabalho, redução de 61,0% na severidade da mancha bacteriana.

Pereira (2008) observou proteção de 54,3% ao utilizar o óleo essencial de cravo-da-índia contra a ferrugem do cafeeiro, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, em que foi observada proteção de 53,0% contra *X. vesicatoria*.

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

### **5.3 Efeito de doses no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação**

Quando foram utilizados os óleos essenciais de citronela, capim-limão, cravo-da-índia e árvore-de-chá somente uma vez antes da inoculação, observou-se que os melhores tratamentos e dosagens foram: citronela 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , capim-limão 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , árvore-de-chá 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e o ASM 0,2g  $\text{L}^{-1}$ , seguidos dos óleos essenciais de citronela 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , capim-limão 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , cravo-da-índia 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e árvore-de-chá 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . O óleo essencial de cravo-da-índia 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  não promoveu controle da mancha bacteriana e os demais tratamentos promoveram eficiência intermediária (Figura 2A).

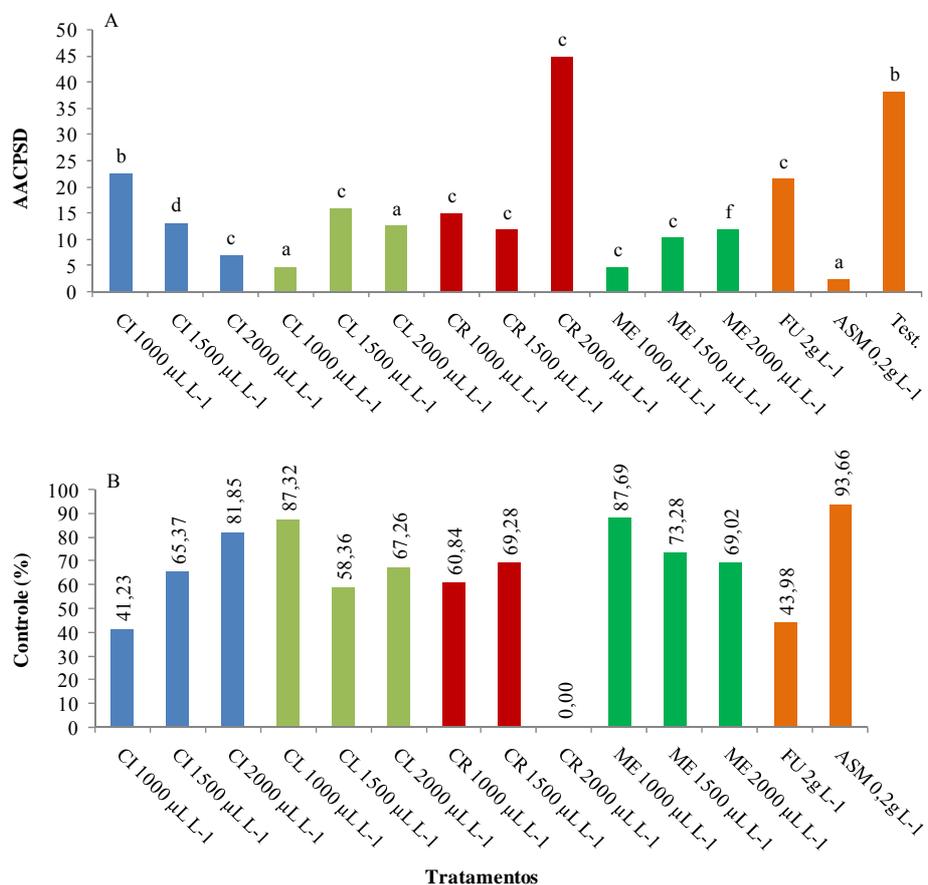


FIGURA 2 Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro (A) e percentagem de controle (B) dos óleos essenciais de citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR) e árvore-de-chá (ME), nas concentrações de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; acibenzolar-S-metil (ASM) e Recop<sup>®</sup> (FU), quando pulverizados somente uma vez antes da inoculação com *Xanthomonas vesicatoria*. Em A, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

A dosagem do óleo essencial de citronela que promoveu maior proteção contra *Xanthomonas vesicatoria* foi 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , seguida de 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  com 81,85%, 65,37% e 41,23%, respectivamente (Figura 2AB). Para o óleo essencial de capim-limão, a melhor dosagem foi 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (87,32%), seguida de 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (58,36%) e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (67,26%) que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 2AB). Para o óleo essencial de cravo-da-índia, as melhores dosagens foram 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , que não diferiram estatisticamente entre si, com percentual de controle de 60,84% e 69,28%, respectivamente (Figura 2AB). Já o óleo essencial de árvore-de-chá promoveu maior controle na dosagem de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (87,69%), seguida da dosagem de 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (73,28%) e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (69,02%) (Figura 2AB). Aplicando-se os tratamentos semanalmente antes e após a inoculação, observou-se que os melhores tratamentos e dosagens foram: ASM 0,2g  $\text{L}^{-1}$ , seguidos dos óleos essenciais de citronela 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , capim-limão 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , cravo-da-índia 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , árvore-de-chá 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os óleos essenciais que promoveram o pior controle da doença foram os óleos de capim-limão 1500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e cravo-da-índia, 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Os demais óleos apresentaram eficiência intermediária, inclusive o fungicida (Figura 3A).

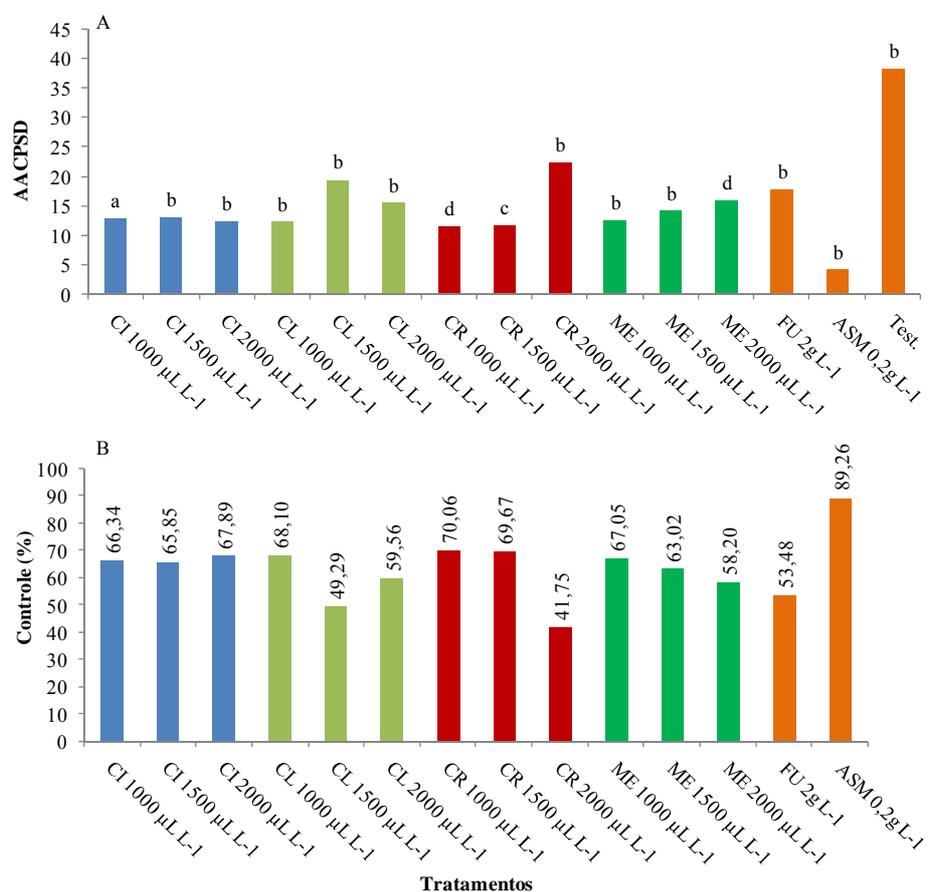


FIGURA 3 Área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha bacteriana do tomateiro (A) e porcentagem de controle (B) dos óleos essenciais de citronela (CI), capim-limão (CL), cravo-da-índia (CR) e árvore-de-chá (ME), nas concentrações de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ ; acibenzolar-S-metil (ASM) e Recop<sup>®</sup> (FU), quando pulverizados de forma semanal antes e após a inoculação com *Xanthomonas vesicatoria*. Em A, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Todas as dosagens do óleo essencial de citronela promoveram, estatisticamente, a mesma proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, em torno de 66,0% (Figura 3AB). Para o óleo essencial de capim-limão, a melhor dosagem foi 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (68,10%), seguida de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (59,56%) e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (49,29%) (Figura 3AB). Para o óleo essencial de cravo-da-índia. As melhores dosagens foram 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$ , que não diferiram estatisticamente entre si, com controle de 70,06% e 69,67%, respectivamente. A dosagem de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  promoveu o pior controle da severidade da mancha bacteriana, quando comparado aos demais óleos e doses, com 41,75% de controle (Figura 3AB). Já o óleo essencial de árvore-de-chá promoveu maior controle na dosagem, de 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$  (67,05%) e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  (63,02%), seguido de 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , com 58,20% de controle (Figura 3AB).

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

São poucos os trabalhos que utilizam diferentes doses de óleos essenciais em experimentos *in vivo*. Normalmente, a dosagem é pré-estabelecida de acordo com a literatura ou de acordo com testes *in vitro*, porém, na literatura são encontradas concentrações diversas e os testes *in vitro* nem sempre são

representativos, pois os patógenos se comportam de forma diferente quando estão interagindo com as plantas e exposto às variáveis ambientais. Dessa forma, fica clara a necessidade de determinar a concentração ideal para a utilização dos óleos essenciais, pois, dessa forma, eles podem ser mais eficientes e mais viáveis economicamente.

#### **5.4 Estudo de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células bacterianas de *Xanthomonas vesicatoria* expostas a óleos essenciais**

Por meio das imagens obtidas foi possível observar os danos sofridos pelas células bacterianas após sua exposição aos óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão, citronela e árvore-de-chá. Na Figura 4 pode-se observar que todos os óleos essenciais utilizados promoveram degradação da parede celular, fato observado também nas células bacterianas expostas ao sulfato de estreptomicina, antibiótico normalmente utilizado como padrão em experimentos *in vitro* com bactérias. Tal degradação tem sido verificada por vários autores em bactérias expostas ao óleo essencial de árvore-de-chá. Gardner & Peel (1991), Carson & Riley (1993, 1994, 1995), Carson et al. (1995) e Raman et al. (1995) observaram que o óleo essencial de árvore-de-chá pode matar uma grande variedade de microrganismos (bactérias gram-negativas, gram-positivas e leveduras), bem como desinfestar ativamente a membrana celular e que desinfestantes ativos desnaturam proteínas da membrana e alteram sua estrutura, levando ao extravasamento citoplasmático, à lise e à morte celular.

Outros estudos demonstraram que alguns componentes do óleo essencial de árvore-de-chá, tais como linalol,  $\alpha$ -terpineol e 1,8 cineol, têm a capacidade de alterar ou penetrar estruturas lipídicas (Williams & Barry 1991; Kararli et al. 1995; Takahashi et al. 1996).

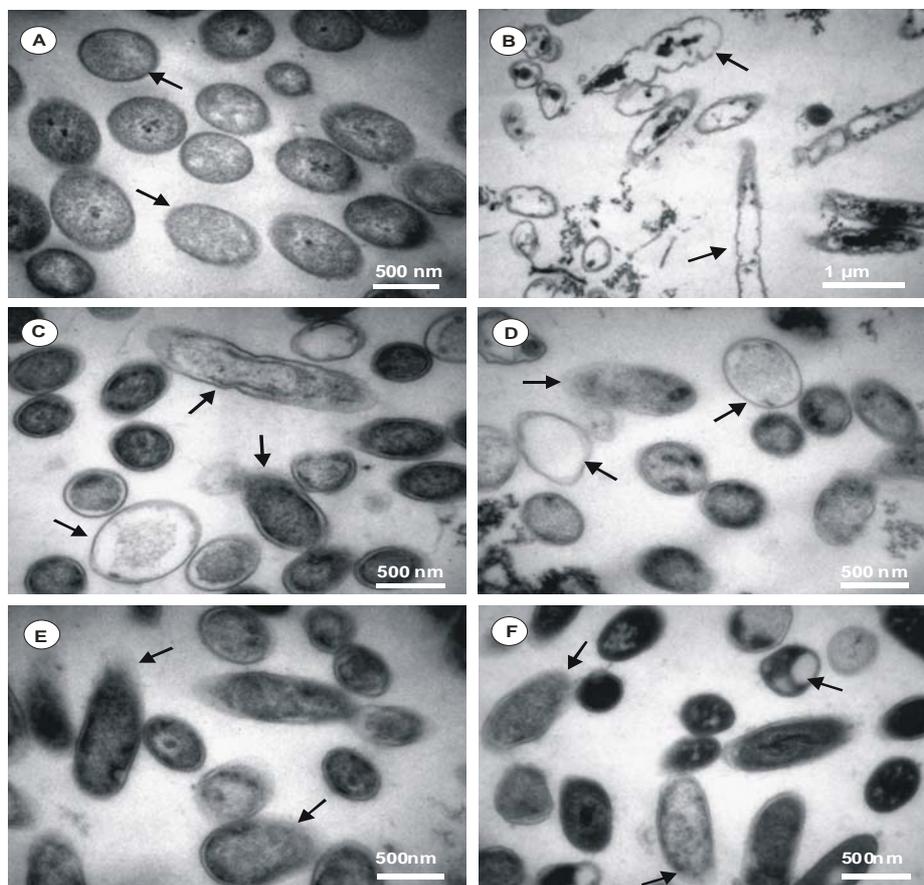


FIGURA 4 Eletromicrografia de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* exposta a óleos essenciais de plantas medicinais na concentração de 0,1%. Testemunha com parede celular íntegra em A (setas). Células bacterianas expostas a sulfato de estreptomicina em B e a óleos essenciais de cravo-da-índia em C; de capim-limão em D, de citronela em E e de árvore-de-chá em F, com aparente degradação da parede celular, alteração na densidade citoplasmática (setas) e, em F, vacuolização da célula (seta).

No presente trabalho também foi possível observar a perda de material eletrodenso em bactérias tratadas com os óleos essenciais e com o sulfato de estreptomicina (Figura 4 e 5), bem como alteração na densidade citoplasmática em todas as células bacterianas tratadas. Esses resultados corroboram os obtidos por Gustafson et al. (1998), os quais também observaram a perda de material eletrodenso das células de *Escherichia coli* tratadas com óleo essencial de árvore-de-chá, indicando a perda de constituintes celulares e quebra da parede celular. Os autores acreditam que o material coagulado observado em algumas células cultivadas na presença do óleo pode representar membranas coaguladas e componentes citoplasmáticos empurrados através de perfurações produzidas na parede celular pela ação do óleo. Estes efeitos já são bem conhecidos em bactérias tratadas com desinfestantes ativos em membranas, como clorexidina e compostos de amônio quaternário (Gardner & Peel 1991).

Amaral et al. (2005), estudando o comportamento do óleo de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre crescimento fúngico em sementes de arroz, soja, milho e feijão, observaram que este apresentou ação fungicida nas concentrações de 0,5% a 0,1, e relataram que o mesmo age, possivelmente, na parede celular do fungo, conseqüentemente provocando o extravasamento celular. Blaszyk & Holley (1998), trabalhando com um composto deste mesmo óleo, o eugenol, comprovaram que o mesmo é ativo contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Estudos com eugenol apresentaram evidências que indicam possíveis papéis nas interações de membrana e inibição de processos específicos ou enzimas celulares (Wendakoon & Sakaguchi, 1995; Helander et al., 1998; Kwon et al., 2003; Walsh et al., 2003).

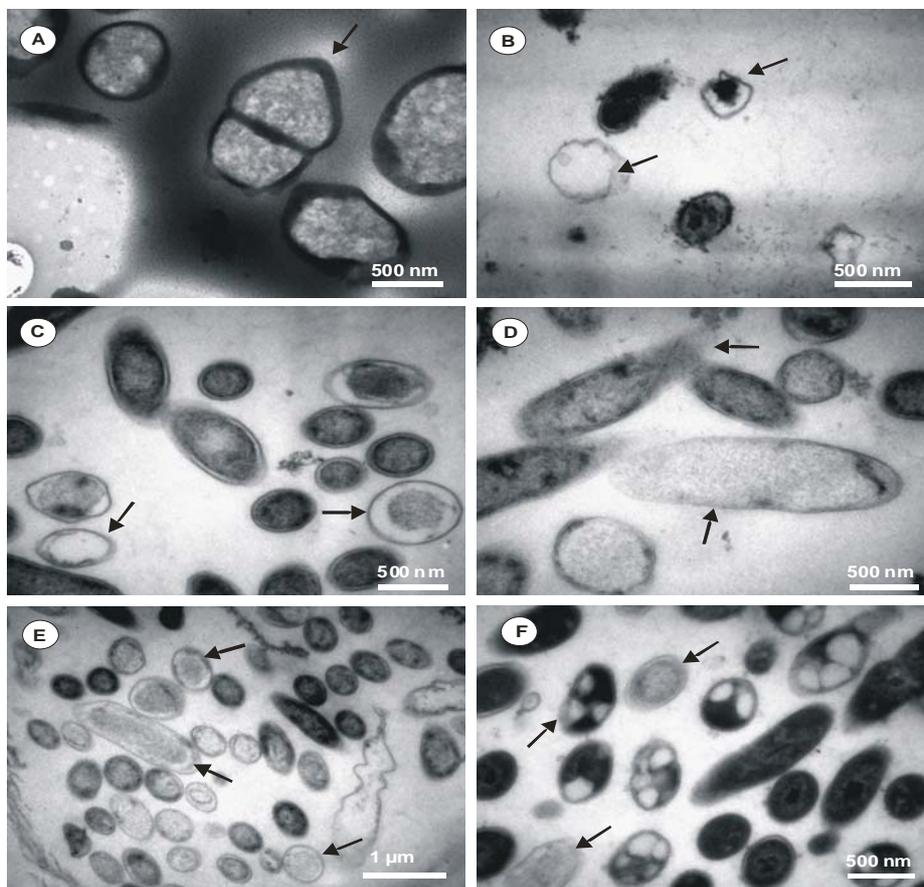


FIGURA 5 Eletromicrografia de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* exposta a óleos essenciais de plantas medicinais na concentração de 0,1%. Testemunha com parede celular íntegra em A (setas). Células bacterianas expostas a sulfato de estreptomicina em B e a óleos essenciais de cravo-da-índia em C, de capim-limão em D, de citronela em E e de árvore-de-chá em F; com aparente degradação da parede celular e alteração na densidade citoplasmática (setas) e, em F, vacuolização da célula (seta).

Ultee et al. (1999) concluiu que o componente hidrofóbico do carvacrol, outro composto presente no óleo essencial de cravo-da-índia, interage com as membranas de *Bacillus cereus*, alterando sua permeabilidade para cátions como  $H^+$  e  $K^+$ . Este fato resulta em uma ação bactericida ou bacteriostática, causando prejuízos para os processos essenciais da célula, como a inibição de várias enzimas devido ao vazamento desses íons essenciais, perda de pressão de turgor, alteração na síntese de DNA e redução das atividades metabólicas. Outro efeito secundário do carvacrol é a perda da integridade de membrana devido à perturbação de interações hidrofóbicas entre lipídios e proteínas, redução da síntese de ATP e, finalmente, morte da célula. O carvacrol também apresenta atividade comprovada nas bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157: H7 (Kim et al., 1995; Cosentino et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (Lambert et al., 2001). Com exceção desses patógenos, poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o mecanismo de atividade antibacteriana dos componentes de óleos essenciais de plantas medicinais (Gill et al. (2006).

Gill et al. (2006) demonstraram que o eugenol e o carvacrol perturbam as membranas celulares de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Lb. Sakei*, quando submetidas à concentração de 10 mM, suficiente obter um efeito bactericida imediato. A ruptura da membrana foi confirmada pelo aumento de ATP extracelular e diminuição de ATP celular.

Piper et al. (2001) também relataram que as substâncias presentes nos óleos essenciais, quando em contato com os microrganismos, afetam a integridade das membranas celulares, causando o extravasamento de seus constituintes.

Saegeman et al. (2007), utilizando a MET, observaram que as células de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* tratadas com glicerol apresentaram degradação da parede celular e alteração na densidade do citoplasma. Os autores

também observaram vacuolização de células de *Staphylococcus epidermidis*.

Não foram encontrados trabalhos de ultraestrutura com os óleos essenciais de citronela e capim-limão, porém, no presente trabalho e com base em outros autores aqui citados, acredita-se que estes apresentem modos de ação semelhantes aos observados em bactérias tratadas com os óleos essenciais de árvore-de-chá, cravo-da-índia e glicerol, devido às características semelhantes observadas nas eletromicrografias apresentadas.

Os óleos essenciais, em geral, são capazes de matar uma gama extensiva de microrganismos e, apesar de sua aceitação difundida como um antimicrobiano natural, pouco se conhece sobre seus efeitos na morfologia e na fisiologia de fitopatógenos. A compreensão do mecanismo de ação desses óleos permitirá o uso racional e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de fitopatógenos menos agressivos ao homem e ao ambiente.

### **5.5 Considerações gerais**

No presente trabalho, apresentaram-se resultados promissores na elucidação do modo de ação dos óleos essenciais de plantas medicinais. O teste *in vitro* mostrou que, a 0,1%, os óleos essenciais não promoveram a inibição do crescimento bacteriano, porém, quando utilizados *in vivo*, no experimento em casa de vegetação, promoveram redução da severidade da doença.

Fica claro que as interações entre patógeno, hospedeiro e meio ambiente interferem na atuação destes óleos essenciais.

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que as bactérias submetidas aos óleos essenciais mais promissores continuaram sua multiplicação. Isso explica o fato de estes óleos não terem promovido halo de inibição no experimento *in vitro*. Observou-se também, por meio da MET, que as bactérias expostas aos óleos essenciais não morrem, entretanto, apresentam alterações na sua morfologia, como degradação da parede celular, na maioria das

vezes de forma parcial, e na fisiologia, com alteração na densidade do citoplasma.

Sabe-se que as proteínas ligadas à motilidade da bactéria estão localizadas no periplama contido entre a parede celular e a membrana plasmática (Horsfall & Cowling, 1980). Pode-se levantar a hipótese, então, de que, quando ocorre a degradação da parede celular, parte dessas proteínas pode ter sido perdida, alterando a capacidade de locomoção da célula bacteriana até os pontos de penetração. A degradação da parede celular pode também ter deixado a célula mais exposta a diversos fatores, como dessecação, choque osmótico, choques bruscos de temperatura, radiações, alterações no pH do ambiente e infecção por bacteriófagos, entre outros. Isso explicaria o porquê do resultado satisfatório do uso dos óleos essenciais *in vivo*.

## 6 CONCLUSÕES

1. A partir da concentração 1,0%, os óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e canela promovem inibição do crescimento de *X. vesicatoria in vitro* e, a 10,0%, todos os óleos essenciais estudados apresentaram este efeito.
2. Em relação à interação entre épocas de aplicação e controle da doença, foi observado que óleos essenciais aplicados somente uma vez antes da inoculação e semanalmente, antes e após a inoculação, apresentam maior eficiência de controle.
3. Os melhores tratamentos são o ASM e os óleos essenciais de árvore-de-chá, capim-limão, cravo-da-índia e citronela.

4. Os óleos essenciais de citronela 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , capim-limão  $\mu\text{L L}^{-1}$ , árvore-de-chá 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e o ASM 0,2g  $\text{L}^{-1}$  são eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados uma única vez, sete dias antes da inoculação.

5. Os óleos essenciais de citronela 1.000, 1.500 e 2.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , capim-limão 1.000  $\mu\text{L L}^{-1}$ , cravo-da-índia 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  e árvore-de-chá 1.000 e 1.500  $\mu\text{L L}^{-1}$  são eficientes contra a mancha bacteriana do tomateiro, quando aplicados semanalmente.

6. Os óleos essenciais de árvore-de-chá, cravo-da-índia, capim-limão e citronela atuam na parede celular de *Xanthomonas vesicatoria* degradando-a, além de afetar a aparência do citoplasma.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, E. S. S. B.; PUPO, M. S.; MARQUES, S. S.; VILCHES, T. T. B.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDO, P. M. A. Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras tropicais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 8, p. 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**, v. 2, n. 2, p. 5-8, dez./jun. 2005. 1 CD-ROM.

BLASZYK, M.; HOLLEY, R.A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 175-183, Feb. 1998.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 128-134, mar./abr. 2004.

BRASIL PORTRAIT. **Óleos essenciais**. Disponível em: <<http://www.brasilportrait.com.br>>. Acesso em: 24 maio 2008.

BULLERMAN, L. B.; LIEW, F. Y.; SEIER, S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 6, n. 42, p. 1107-1109, nov./dez., 1977.

CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 35, n. 3, p. 421-424, Mar. 1995.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 16, p. 49-55, Feb. 1993.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 264-269, Feb. 1995.

CARSON, C. F.; RILEY, T.V. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 24-25, July 1994.

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

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.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTÀ, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 130-135, Aug. 1999.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v.28, p.29-38, jan/mar 2007.

GARDNER, J. F.; PEEL, M. M. Principles of chemical disinfection. In: \_\_\_\_\_. **Introduction to sterilization, disinfection and infection control**. 2. ed. London: Churchill Livingstone, 1991. p. 170-192.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p.1-9, Apr. 2006.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M. de; KYDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de caféiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 89-94, jan./jun. 2001.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, Y.; POL, L.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. von. Characterization of the action of selected essential oils components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Aug. 1998.

HORSFALL, J. C.; COWLING, E. B. (Ed.). **Plant disease: an advanced treatise**. New York: Academic, 1980. v. 4.

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

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 96-97, June 1970.

KARARLI, T. T.; KIRCHHOFF, C. F.; PENZOTTI, S. C. Enhancement of transdermal transport of azidothymidine (AZT) with novel terpene and terpene-like enhancers- *in vivo in vitro* correlations. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 43-51, Apr. 1995.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, Nov. 1995.

KWON, J. A.; YU, C. B.; PARK, H. D. Bactericidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 61-65, Jan. 2003.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LOBO, V. L. da S.; GIORDANO, L. de B.; LOPES, C. A. Herança da resistência à mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, jul./ago. 2005.

MEDICE, R. **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja**. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; JÚNIOR, M. R. G.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 447-448, maio 1997.

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

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

PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, Washington, v. 147, n. 10, p. 2635-2642, Oct. 2001.

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

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, New York, v. 63, n. 5, p. 569-575, July 2003.

RAMAN, A.; WEIR, U.; BLOOMFIELD, S. F. Antimicrobial effects of tea tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 242-245, Oct. 1995.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 359-364, May 2006.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mounting wright wrinkle: free sections on formvar, coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 151-155, 1975.

SAEGEMAN, V. S. M.; DE VOS, V.; TEBALDI, N. D.; VAN DER WOLF, J. M.; BERGERVOET, J. H. W.; VERHAEGEN, J.; LISMONT, D.; VERDUYCKT, B. Flow cytometric viability assessment and transmission electron microscopic morphological study of bacteria in glycerol. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 13, n. 1, p. 18-29, Feb. 2007.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar./abr. 2003.

SANTOS, M. P.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P.M.B. 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, n. 8, p. 335, ago. 2001. Suplemento.

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, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. 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.

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

TAKAHASHI, K.; HASAKA, M.; HANABUSA, Y. Dispersion of the of stratum corneum in aqueous mixed solutions of surfactant and terpene—the effect of mixtures of N,N-dimethyldodecylamine and alpha-terpineol. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p.273-282, abr. 1996.

ULTEE, A.; KETS, E. P.W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, V. F.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p.536-539, abr. 2004.

VIGO-SCHULTZ, S. C.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. 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.

WALSH, S. E.; MAILLARD, J. Y.; RUSSEL, A. D.; CATRENICH, C. E.; CHARBONNEAU, D. L.; BARTOLO, R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 240-247, Feb. 2003.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 280-283, Mar. 1995.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. **Pharmacology Research**, London, v. 8, n. 1, p. 17-24, Jan. 1991.

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**

Óleo essencial de cravo-da-índia e acibenzolar-S-metil no controle da mancha bacteriana do tomateiro.

## 1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial do óleo essencial de cravo-da-índia e do acibenzolar-S-metil na redução da mancha bacteriana do tomateiro e na ativação de algumas respostas bioquímicas de defesa da planta. Mudas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e óleo essencial de cravo-da-índia (0,1%) e, sete dias depois, submetidas à inoculação de *Xanthomonas vesicatoria*. Acibenzolar-S-metil apresentou controle de 89,0% e o óleo essencial de cravo-da-índia, 53,0%. A resistência induzida em planta pelos indutores acibenzolar-S-metil e óleo essencial de cravo-da-índia foi evidenciada pelo aumento na atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases, iniciado logo nas primeiras horas após a pulverização até 12 dias após a mesma e do aumento do teor de lignina aos 12 dias após as pulverizações. O acibenzolar-S-metil e o óleo essencial de cravo-da-índia são potenciais indutores de resistência para o manejo da mancha bacteriana em tomateiro.

**Palavras-chave:** *Xanthomonas vesicatoria*, resistência induzida, PR proteínas, lignina, respostas de defesa da planta.

---

\*Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (orientador), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

## 2 ABSTRACT

The goals of this work were to assess the potential of acibenzolar-S-methyl and clove essential oil on the reduction of tomato bacterial spot, and the activation of some plant biochemical defense responses. Tomato plants cv. Santa Cruz Kada were sprayed with acibenzolar S-methyl ( $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and Indian clove essential oil ( $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and, inoculated with *Xanthomonas vesicatoria* seven days later. The acibenzolar S-methyl presented a control of 89.0% and the Indian clove essential oil 53.0%. The expression of the induced resistance by acibenzolar S-methyl and Indian clove essential oil was evidenced by the increase at  $\beta$ -1,3-glucanases, chitinases, peroxidases enzymes activity. They were starting in the first hours after spraying up to 12 days after. The lignin content increase was observed 12 days after spraying. The acibenzolar-S-methyl and the clove essential oil are potential resistance inductor for the management of the tomato bacterial spot.

**Key words:** *Xanthomonas vesicatoria*, induced resistance, PR protein, lignin, plant defense response.

---

\*Guidance Committee: Eduardo Alves – UFLA (Advisor), Ricardo Magela de Souza - UFLA, Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana tem como agente etiológico bactérias do gênero *Xanthomonas* (Dowson) (Jones et al., 2000) e está entre as doenças mais importantes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em todo o mundo. Essa doença ocorre, preferencialmente, em ambiente quente e úmido e limita a produtividade de lavouras comerciais de tomateiro no Brasil.

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

A ativação das defesas naturais da planta por meio da resistência sistêmica adquirida (RSA) tem se destacado como uma das estratégias para o controle da mancha bacteriana (Louws et al., 2001), em que moléculas eliciadoras ativam a resistência sistêmica na planta, a qual protege os tecidos contra o ataque subsequente de uma ampla gama de patógenos (Hammond-Kosack & Parker, 2003). A RSA é expressa, tanto local quanto sistemicamente, em resposta a patógenos que causam lesões necróticas (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o éster S-metil do ácido benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioico (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). A resistência expressa está associada ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs). Estas possuem atividade antimicrobiana, são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Hammerschmidt & Smith-Becker, 1999) e são mediadas por um processo dependente do ácido salicílico.

Outros processos de defesa podem ser incluídos, como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (Durrant & Dong, 2004).

Vários produtos químicos e naturais vêm sendo descobertos e parecem atuar em diferentes pontos nas vias de ativação de defesa de plantas, imitando parte ou toda a ativação biológica de resistência.

O acibenzolar-S-metil (ASM) é o ativador de resistência mais estudado e o primeiro produto comercial sob os nomes de Bion<sup>®</sup>, ACTIGARD<sup>™</sup> e BOOST<sup>®</sup> (Venâncio et al., 2000). A cultura do tomateiro concentra a maior parte dos estudos com ASM. Silva et al. (2001a) verificaram redução na incidência de *Ralstonia solanacearum*, após duas pulverizações foliares (2,5 g i.a./100 L) e em torno de 50% a 60% na severidade da mancha bacteriana em relação à testemunha, após três pulverizações do produto (Silva et al., 2001b, 2003). Outro produto alternativo, ainda pouco estudado, a ser utilizado na agricultura orgânica em substituição ao ASM é o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (Linne) Merrill).

Ponce et al. (2003) verificaram atividade antimicrobiana desse óleo sobre o crescimento de bactérias, na concentração de 500 µL L<sup>-1</sup> pelo método mínimo de concentração. Sabe-se que os óleos de plantas medicinais são alternativas para o controle de fitopatógenos com a vantagem de não poluírem o ambiente (Stangarlin et al., 1999) e induzirem respostas de defesa na planta, por meio de fitoalexinas, peroxidases e proteínas relacionadas à patogênese (Schwan-Estrada, 2002; Kagade et al., 2004), o que indica a presença de compostos com característica de eliciadores.

Diante dos desafios enfrentados pelos produtores, torna-se necessário o estudo de novas alternativas para o manejo integrado de doenças, mediante a utilização de produtos menos agressivos ao meio ambiente, bem como do modo como esses produtos agem na planta.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, verificar o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia e do acibenzolar-S-metil no controle da mancha bacteriana do tomateiro e caracterizar as reações bioquímicas desenvolvidas em função do estímulo de indução no patossistema tomateiro *versus Xanthomonas vesicatoria*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) e de Bacteriologia de Plantas e em casa de vegetação, no Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, a 960 m de altitude, nas coordenadas 44,97° de longitude oeste e 21,22° de latitude sul. O período de experimento foi de janeiro a dezembro de 2008.

### 4.1 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial utilizado foi adquirido da Brasil Portrait® (2008).

### 4.2 Origem, preservação, isolamento e preparo da suspensão de *Xanthomonas vesicatoria*

Foi utilizado neste trabalho o isolado 89T de *Xanthomonas vesicatoria* cedido pela Embrapa Hortaliças, DF. A bactéria foi preservada em peptona glicerol no *deep freezer* e inoculada em plantas de tomateiro para confirmação do seu potencial de virulência. Folhas sintomáticas dessas plantas foram utilizadas como fonte de inóculo.

O isolamento da bactéria foi feito a partir das folhas previamente infectadas, em meio 523 de Kado & HesKett (1970) (MB1), pela técnica de

estrias paralelas. Posteriormente, a bactéria foi cultivada no mesmo meio a 28°C, durante 24 horas, para o preparo das suspensões a serem inoculadas. A concentração da suspensão bacteriana utilizada em todos os experimentos foi ajustada em espectrofotômetro para  $A_{600} = 0,30$ , correspondendo a, aproximadamente,  $5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.3 Realização dos experimentos

Para examinar o potencial do óleo essencial de cravo-da-índia em inibir o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*, foram utilizadas as concentrações de 0,1%, 1,0%, 10,0% e 100,0% e acibenzolar-S-metil (ASM) 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (padrão de indução de resistência), leite em pó 1,0% como emulsificante para o tratamento à base de óleo, sulfato de estreptomicina 25mg mL<sup>-1</sup> e água esterilizada, como testemunhas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. Discos de papel de filtro autoclavados de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 20 µL de cada substância testada, secos à temperatura ambiente e colocados em placas de Petri contendo meio 523 de Kado & HesKett (1970) e 100 µL da suspensão de *X. vesicatoria*. A presença e o diâmetro dos halos de inibição foram avaliados 48 horas depois da incubação, em câmara de crescimento ajustada para 28°C.

Com o objetivo de avaliar o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia no controle da mancha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação, utilizou-se a concentração de 0,1%, adicionada de leite em pó 1,0%. Dois tratamentos adicionais, acibenzolar-S-metil 0,2 mg mL<sup>-1</sup>, como padrão de indução de resistência e Recop<sup>®</sup> 2,0 mg mL<sup>-1</sup>, como padrão de cobre, além das testemunhas inoculada, absoluta e leite em pó foram utilizados. Os tomateiros foram tratados aos 23 dias após a semeadura (DAS) e a inoculação ocorreu aos 30 DAS. As avaliações iniciaram-se sete dias depois. A inoculação foi realizada em plantas de tomate previamente expostas a câmara úmida por um período de 24 horas, via

pulverização foliar, até o ponto de escorrimento e, posteriormente, foi realizada nova câmara úmida por mais um período de 24 horas, para garantir a eficiência da inoculação. Os experimentos foram conduzidos em delineamento blocos casualizados, com cinco repetições e parcela constituída de seis plantas.

Foram realizadas cinco avaliações da severidade da mancha bacteriana, utilizando-se a escala de Mello et al. (1997). Posteriormente, foram calculadas as áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de cada tratamento, conforme a fórmula proposta por Shaner & Finney (1977), e a porcentagem de controle dos tratamentos em relação à testemunha.

Para caracterizar os mecanismos bioquímicos de defesa do tomateiro à *Xanthomonas vesicatoria*, induzidos pelo estímulo do óleo essencial de cravo-da-índia, foi realizado outro experimento. Sementes de tomateiro cv. Santa Cruz Kada foram semeadas em vasos de 3 L contendo substrato comercial Plantmax HT<sup>®</sup>. Aos 15 dias de idade, as plantas foram tratadas com o óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1% (com e sem inoculação), acibenzolar-S-metil (ASM - 0,2 mg mL<sup>-1</sup>) (com e sem inoculação) e testemunha (com e sem inoculação). Foi utilizado o delineamento blocos casualizados, com três repetições e unidade experimental composta por um vaso contendo três plantas. A inoculação com *X. vesicatoria* ocorreu 4 dias após o tratamento e as coletas aos ½, 1, 2, 4, 5, 6, 9 e 12 dias após o tratamento. As folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para análises posteriores.

Para o preparo do extrato proteico, o tecido foliar foi homogeneizado, por meio de almofariz e pistilo, em 3 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 x g, por 15 minutos e o sobrenadante recuperado. Todos os passos foram executados a 0-4°C. A concentração de proteína total solúvel foi aferida com a utilização de

uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) ajustada para 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, conforme ensaio de Bradford (1976).

A atividade de quitinases 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 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), 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°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 foi medida seguindo método análogo ao da quitinase, apenas com a troca do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) 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 °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 peroxidases de guaiacol (atividade de POX) foi determinada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático ajustado para 2 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°C, por 10 minutos, mediu-se a absorvância a 480 nm (Urbanek et al., 1991). Uma unidade de POX foi expressa como a variação de 1  $\text{OD}_{480}$  por miligrama de proteína solúvel por minuto ( $\Delta_{480\text{nm}} \text{mg P}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

O conteúdo de lignina foi determinado pelo ensaio com ácido tioglicólico (TGA) (Monties, 1989), em que 0,2 g de tecidos meristemáticos

foram incubados em acetona (85%), por 48 horas e centrifugados, a 7.500 x g, por 15 minutos. O precipitado foi seco e incubado com 5 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 µl de HCl 10 N. Após o banho de gelo por 4 horas e centrifugação a 7.500 x g por 30 minutos, o precipitado obtido foi homogeneizado em 5 mL de NaOH 0,5 N e a absorbância medida a 280 nm. A quantidade de derivados TGA (lignina ácido-solúvel) formada foi medida pela comparação com uma curva padrão (0,01-0,1 mg éter 2-hidroxipropílico mL<sup>-1</sup>) e os valores expressos em micrograma de lignina por miligrama de matéria fresca (µg mg<sup>-1</sup> MF). Todas as determinações foram realizadas em duplicatas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos *in vitro* de quatro concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia (CR), acibenzolar-S-metil (ASM) e do sulfato de estreptomicina sobre o crescimento radial de *Xanthomonas vesicatoria* são apresentados na Figura 1.

Observou-se que todos os tratamentos testados promoveram o aparecimento de halos de inibição, com exceção do CR a 0,1% e do ASM. Segundo Kessmann et al. (1994), compostos químicos ou biológicos, para serem considerados indutores de resistência, não devem possuir atividade inibitória direta sobre o microrganismo patogênico. Entretanto, há, atualmente, uma flexibilização desse conceito, e vários compostos considerados indutores de resistência apresentam também ação direta sobre patógenos.

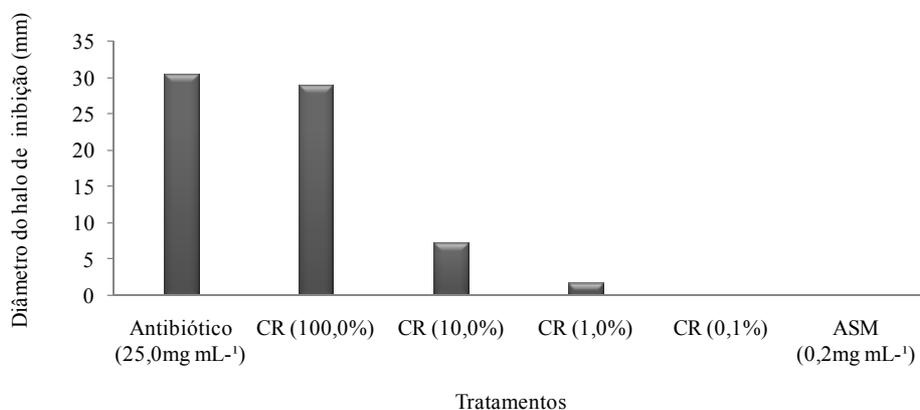


FIGURA 1 Inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria* submetida a diferentes concentrações do óleo essencial de cravo-da-índia (CR), sulfato de estreptomicina (antibiótico) e acibenzolar-S-metil (ASM).

Em condições de casa de vegetação, todos os tratamentos controlaram a mancha bacteriana no tomateiro, reduzindo o progresso da doença (Figura 2). O ASM foi o tratamento mais eficiente na redução da severidade da doença, com controle de 89,0%, seguido do CR com 53,0%. O fungicida Recop<sup>®</sup>, utilizado como protetor na cultura do tomateiro, apresentou pouca eficiência em relação aos demais tratamentos, promovendo redução de 26,0% na severidade da doença.

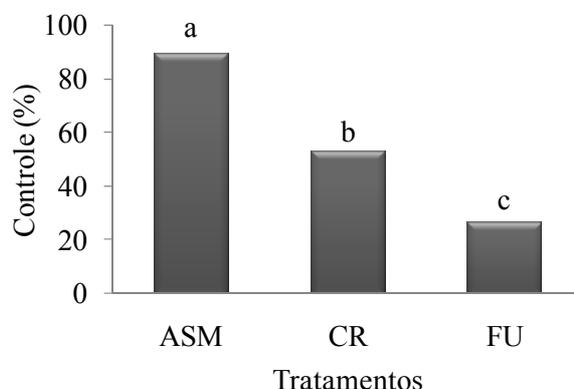


FIGURA 2 Controle da mancha bacteriana do tomateiro por meio da aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM)  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , óleo essencial de cravo-da-índia (CR) 0,1% e Recop<sup>®</sup> (FU)  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , aos 7 dias antes da inoculação.

Com relação à caracterização dos mecanismos bioquímicos de defesa avaliados, observou-se um aumento relativo das atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases e do teor de lignina (Figuras 3, 4, 5 e 6). Observou-se que a inoculação com *X. vesicatoria* aumentou a atividade dessas enzimas e o teor de lignina em folhas de tomateiro para todos os tratamentos, inclusive na testemunha. Esse comportamento é um indicativo de que a inoculação, por si só, pode promover aumento na atividade das enzimas.

Plantas pulverizadas apenas com os tratamentos tenderam ao aumento de  $\beta$ -1,3-glucanases entre 12 horas após a pulverização (hap) e 12 dias após a pulverização (DAP), enquanto entre as plantas inoculadas com a bactéria, apenas as pulverizadas com ASM manifestaram tendência de aumento da atividade da enzima. Plantas pulverizadas com ASM, inoculadas e não inoculadas apresentaram máxima atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases aos 12 DAP, com 8,92% e 35,33% de aumento de atividade da enzima em relação às testemunhas inoculada e não inoculada, respectivamente (Figura 3 A). Plantas pulverizadas com CR,

inoculadas e não inoculadas apresentaram máxima atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases aos 9 DAP, com 52,29% e 58,29% de aumento da atividade da enzima em relação às testemunhas inoculada e não inoculada, respectivamente (Figura 3 B), caracterizando aumentos na atividade da enzima superiores aos obtidos pelo ASM. Observou-se também que plantas pulverizadas com ASM e CR, inoculadas e não inoculadas, manifestaram tendência de aumento de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases em todo o período de coleta, por vezes não significativas. O mesmo foi observado por Cavalcanti et al. (2006) ao utilizar ASM em plantas de tomateiro inoculadas e não inoculadas com *X. vesicatoria* entre 3 e 12 DAP.

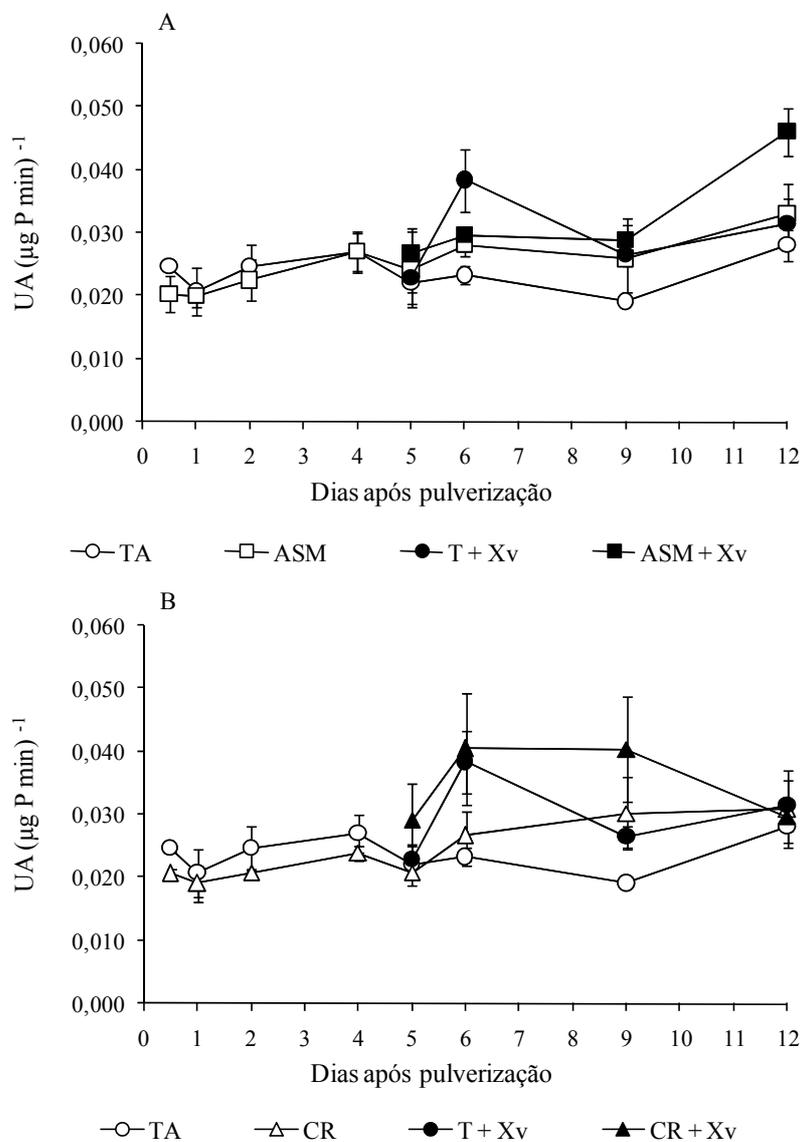


FIGURA 3 Atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase, em plantas de tomateiro submetidas aos tratamentos: ASM (acibenzolar-S-metil) e testemunha (A) e CR (óleo essencial de cravo-da-índia) e testemunha (B). Plantas inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* quatro dias após pulverização. Barras indicam erro padrão da média.

Plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com a bactéria apresentaram dois períodos de incremento na atividade de quitinase, de 5 a 6 DAP e 9 a 12 DAP (Figura 4 A). A máxima atividade foi observada aos 6 DAP, porém, não diferiu significativamente da testemunha inoculada. Aos 12 DAP, as plantas apresentaram aumento de 41,93% na atividade da enzima em relação à testemunha inoculada. Plantas somente pulverizadas com ASM obtiveram máxima atividade da enzima aos 4 DAP, com 85,94% de aumento de atividade em relação à testemunha pulverizada com água. Em relação ao CR, verificou-se que as plantas de tomateiro pulverizadas e inoculadas com *X. vesicatoria* apresentaram decréscimo na atividade de quitinase até a última coleta e que a máxima atividade desta enzima ocorreu aos 5 DAP, com 62,72% de aumento em relação à testemunha inoculada (Figura 4 B).

Plantas pulverizadas somente com o CR apresentaram dois períodos de incremento na atividade de quitinase: 12 HAP a 4 DAP e 9 a 12 DAP. Assim como as plantas pulverizadas somente com ASM, as pulverizadas somente com CR apresentaram máxima atividade de quitinase aos 4 DAP, com 69,79% de aumento em relação à testemunha pulverizada com água. Houve redução na atividade de quitinase aos 12 DAP, no entanto, com 56,70% de aumento em relação à testemunha pulverizada somente com água. Segundo Cavalcanti et al. (2006), uma correlação estreita entre a enzima estudada e suas funções hidrolíticas no contra-ataque da planta à infecção bacteriana ainda é pouco conhecida. Existem relatos de que endoquitinases com atividade lisozímica podem hidrolisar ligações  $\beta$ -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina no peptidoglicano da parede bacteriana (Majeau et al., 1990). Entretanto, pode-se afirmar que um arsenal de defesa tenha sido eliciado depois da pulverização das plantas com o ASM e com o CR.

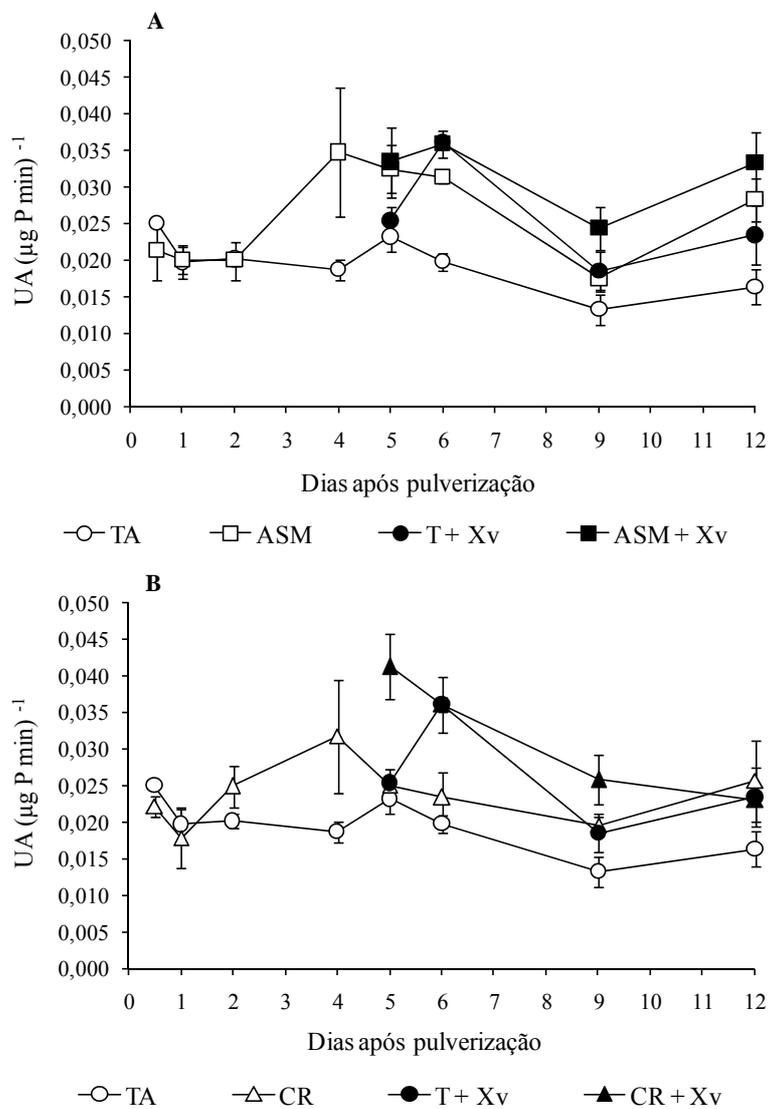


FIGURA 4 Atividade de quitinase, em plantas de tomateiro submetidas aos tratamentos: ASM (acibenzolar-S-metil) e testemunha (A) e CR (óleo essencial de cravo-da-índia) e testemunha (B). Plantas inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria*, quatro dias após pulverização. Barras indicam erro padrão da média.

Plantas pulverizadas com ASM e inoculadas com a bactéria apresentaram dois períodos de incremento na atividade de peroxidase: 5 a 6 DAP e 9 a 12 DAP (Figura 5 A). A máxima atividade da enzima ocorreu aos 6 DAP, porém, não diferiu significativamente da testemunha inoculada. Aos 12 DAP houve aumento de 110,5% na atividade da enzima em relação à testemunha inoculada. Plantas pulverizadas somente com ASM obtiveram máxima atividade da enzima aos 12 DAP, com 266,03% de aumento em relação à testemunha pulverizada com água. Nas plantas de tomateiro pulverizadas com CR e inoculadas com *X. vesicatoria*, verificaram-se dois períodos de incremento na atividade da enzima: 5 a 6 DAP e 9 a 12 DAP (Figura 5 B).

A máxima atividade da enzima ocorreu aos 6 DAP, porém, de forma não significativa da inoculada e, aos 12 DAP, apresentaram atividade da enzima com 62,14% de aumento em relação à testemunha inoculada. Plantas somente pulverizadas com CR obtiveram máxima atividade da enzima aos 2 DAP, com 93,28% de aumento em relação à testemunha pulverizada com água. Entretanto, observa-se que a atividade da peroxidase nas plantas pulverizadas com o óleo manteve-se superior em todo o período de coleta, quando comparada à testemunha pulverizada com água, fato por vezes não significativo, como aos 9 DAP.

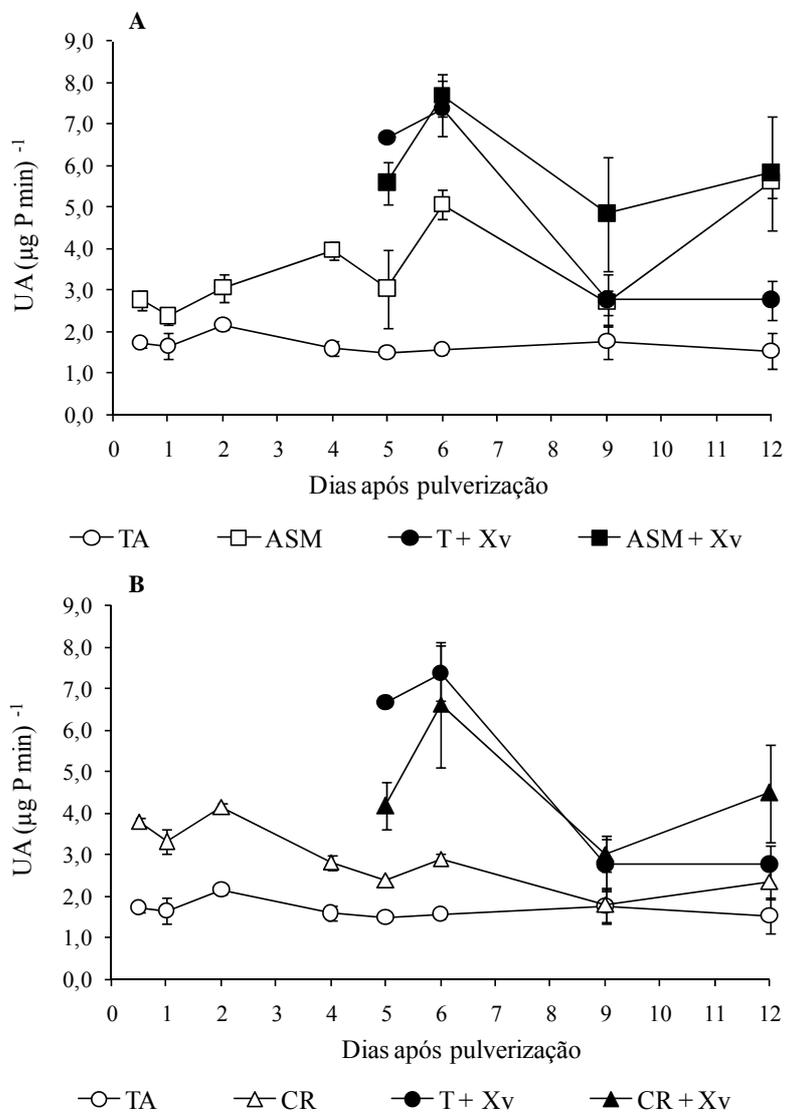


FIGURA 5 Atividade de peroxidase de guaiacol em plantas de tomateiro submetidas aos tratamentos: ASM (acibenzolar-S-metil) e testemunha (A) e CR (óleo essencial de cravo-da-índia) e testemunha (B). Plantas inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria*, quatro dias após pulverização. Barras indicam erro padrão da média.

A participação das peroxidases na resistência induzida de tomateiro contra *X. vesicatoria* foi demonstrada por Cavalcanti et al. (2006), que relataram aumento na atividade dessas enzimas logo nas primeiras horas após a pulverização das plantas com ASM e Ecolife<sup>®</sup>, ocorrendo maior atividade no quinto dia após a inoculação do patógeno. Fato semelhante foi observado por Ribeiro Júnior et al. (2004), em plantas de tomate tratadas com ASM, que apresentaram picos de atividades de peroxidases tanto nas plantas inoculadas quanto não inoculadas com *X. vesicatoria*, aos 9 DAP e por Soylu et al. (2003), no patossistema tomate *versus Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, aos 14 dias.

Segundo Silva et al. (2007) a atividade de peroxidase tem sido implicada em uma variedade de processos relacionados com a defesa das plantas, incluindo reação de hipersensibilidade, lignificação e suberização. Em tomateiro, a peroxidase é uma das enzimas envolvidas no último passo na lignificação. O reforço da parede celular por lignina e compostos fenólicos aumenta a resistência da planta à degradação enzimática por patógenos e atua como uma barreira mecânica ao ingresso de toxinas, bem como à penetração física.

Em relação às concentrações de lignina solúvel, as plantas pulverizadas com ASM e CR, com e sem inoculação de *X. vesicatoria*, apresentaram teores superiores ao da testemunha (Figura 6).

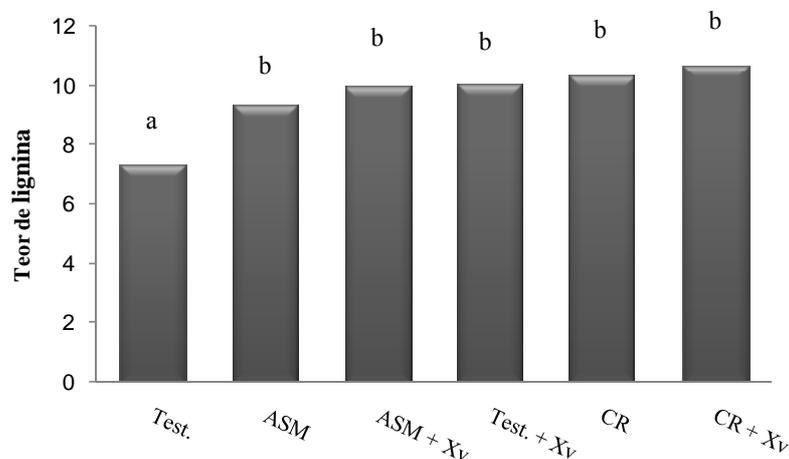


FIGURA 6 Teor de lignina solúvel ( $\mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ ) em folhas de mudas de tomateiro, aos 12 dias após tratamentos com: ASM – acibenzolar-S-metil e óleo essencial de cravo-da-índia (CR) comparado com a testemunha (Test.). A inoculação com *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) ocorreu 4 dias após pulverização. Colunas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

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

Este trabalho teve como objetivo final obter, por meio do uso do óleo essencial de cravo-da-índia, uma nova estratégia de manejo fitossanitário que possa ser repassada para os produtores rurais, tanto os convencionais como os de agricultura orgânica. Espera-se esta estratégia possa minimizar os custos financeiros e o prejuízo ambiental ocasionado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos.

## 6 CONCLUSÕES

1. O óleo essencial de cravo-da-índia a 0,1% e o acibenzolar-S-metil (0,2mg mL<sup>-1</sup>) não inibem o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas vesicatoria*.
2. O óleo essencial de cravo-da-índia e o acibenzolar-S-metil conferem capacidade parcial de proteção em plantas de tomateiro desafiadas por *Xanthomonas vesicatoria*.
3. O óleo essencial de cravo-da-índia e acibenzolar-S-metil promovem aumento da atividade das enzimas peroxidase, quitinase e glucanase, bem como a lignificação da parede celular.
4. O óleo essencial de cravo-da-índia é um produto promissor no controle da mancha bacteriana em cultivos orgânicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, n. 1/2, p. 248-254, May. 1976.

BRASIL PORTRAIT. **Óleos essenciais**. Disponível em: <<http://www.brasilportrait.com.br>>. Acesso em: 24 maio 2008.

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

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

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.

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

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 96-97, June 1970.

KAGADE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. 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. 2, p. 91-100, Aug. 2004.

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

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

MAJEAU, N.; TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Diversity of cucumber chitinase isoforms and characterization of one seed basic chitinase with lysozyme activity. **Plant Science**, Saint Paul, v. 68, n. 1, p. 9-16, Jan. 1990.

MELLO, S. C. M., TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 447-448, set. 1997.

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

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

PEREIRA, R. B.; ALVES, E.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V. de; LUCAS, G. C.; FERREIRA, J. B. 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, dez. 2008.

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

RESENDE, M. L. V. de; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F. R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 213-221, maio 2007.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PEREIRA, R. B.; ZACARONI, A. B.; CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V. Lignificação induzida por extratos aquosos naturais e produtos comerciais em tomateiro infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37., 2004, Gramado. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2004. v. 29, p. 261.

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

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, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

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

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

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

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**, v. 32, n. 3, p.189-196, maio 2007.

SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, Nov. 2003.

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

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

VENÂNCIO, W. S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E. L.; SOUZA, N. L.; PERES, N. A. R. P. Novos fungicidas II: famoxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 59-92, jun. 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, July 1990.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sociedade tem se mostrado cada vez mais preocupada com o meio ambiente.

O Brasil é um dos países mais ricos do mundo, no que se refere à diversidade de espécies vegetais. É necessário explorar nossas reservas naturais e buscar substâncias que atuem sobre pragas e doenças de plantas, de forma a minimizar os efeitos negativos do uso indiscriminado de substâncias químicas e aumentar a produção de alimentos de melhor qualidade, propiciando, assim, o desenvolvimento de uma agricultura alternativa e sustentável.

É nesse contexto que aparecem os métodos alternativos de controle de doenças de plantas, com produtos menos tóxicos ao meio ambiente, aos trabalhadores rurais e aos consumidores.

Os óleos essenciais provenientes da flora medicinal representam um método alternativo no controle de doenças de plantas, uma vez que estes, além de apresentarem em sua composição substâncias com elevado poder antimicrobiano, podem induzir a síntese de fitoalexinas e de outros compostos de defesa.

De acordo com os experimentos conduzidos para a realização deste trabalho, fica clara a ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, citronela, capim-limão, árvore-de-chá, eucalipto e tomilho sobre a mancha bacteriana do tomateiro. Este fato indica que estes óleos podem ser utilizados em produções orgânicas de tomateiro, de forma a agregar valor ao produto e torná-lo mais saudável para o consumo *in natura*.