

ADRIANA TERUMI ITAKO

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
Alternaria solani E ATIVAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA EM TOMATEIRO**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2008

ADRIANA TERUMI ITAKO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM *Alternaria solani* E ATIVAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO - 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-
Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR.,
Brasil)

I88o Itako, Adriana Terumi
Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro / Adriana Terumi Itako. -- Maringá : [s.n.], 2008.
51 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração: Proteção de Plantas, 2008.

1. Indução de resistência. 2. Peroxidase. 3. *Alternaria solani*. 4. Tomate. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. II. Título.

CDD 21.ed. 632.4

ADRIANA TERUMI ITAKO

ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM *Alternaria solani* E ATIVAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. **José Renato Stangarlin**

Prof^a. Dr^a. **Maria Eugênia da Silva Cruz**

Prof^a. Dr^a. **Kátia Regina Freitas Schwan Estrada**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e saúde que Ele me concedeu durante esses anos da minha vida, para vencer obstáculos e presenciar muitas alegrias.

Agradeço à minha família, meu pai Mitsuo Itako, e meus irmãos Juliana e Fábio que sempre estiveram apoiando, incentivando-me, principalmente nesta etapa tão importante.

Em especial agradeço a minha irmãzinha e amiga Regina.

À minha MÃE, Mituyo Takahashi Itako (*in memorian*) que mesmo não estando mais presente entre nós, com certeza esteve e esta sempre ao meu lado e da minha família torcendo por nós.

Agradecimento em especial à minha orientadora e amiga Kátia Regina F. Schwan-Estrada com a qual tive o prazer de trabalhar, me apoiando com paciência, dedicação, e pelo respeito perante meus ideais.

Ao meu querido João pelo companheirismo incondicional.

Ao Leonel, pelas palavras amigas de incentivo.

Ao professor José Renato Stangarlin, Maria Eugênia da Silva Cruz e Odair Kuhn pelo apoio e informações úteis compartilhadas.

Ao Grupo de Pesquisa de Indução de Resistência (GPIR), e em especial a Maria Isabel, Cláudia, Renata, Rafael, Danila e Marinelva.

Aos meus amigos Daniel, Rodrigo, Lukinha, Gustavo e Fernando pelo apoio e ajuda durante mais uma fase da minha vida e a todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior, pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

ADRIANA TERUMI ITAKO, filha de Mitsuo Itako e Mituyo Takahashi Itako, nasceu em Marialva-PR, aos 06 dias do mês de dezembro de 1981. Aos 6 anos veio com a família residir em Maringá.

Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, em março de 2001, e graduou-se em fevereiro de 2006.

Em março de 2006, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá, sob orientação da Prof^a Dr^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, na área de concentração em Proteção de Plantas.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Importância da cultura do tomateiro	3
2.2	Aspectos gerais da doença pinta preta	3
2.3	Agente causal: <i>Alternaria solani</i>	4
2.4	Controle da pinta preta	4
2.5	Indução de resistência.....	5
2.6	Enzimas envolvidas na indução de resistência	8
2.6.1	Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)	8
2.6.2	Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1)	9
2.6.3	β -1,3 glucanase (E.C 3.2.1.39).....	10
2.7	Plantas medicinais no controle de doenças e indução de resistência	12
2.8	<i>Cymbopogon citratus</i> no controle de fitopatógenos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Sensibilidade de plantas de tomateiro ao óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> ..	18
3.2	Atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	19
3.3	Indução de resistência local e sistêmica	20
3.4	Análises bioquímicas	21
3.4.1	Atividade da peroxidase	21
3.4.2	Atividade da polifenoloxidase	21
3.4.3	Atividade de β -1,3 glucanase	22
3.4.4	Proteínas totais.....	22
3.5	Avaliação dos mecanismos estruturais	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1	Sensibilidade de plantas de tomateiro ao óleo	24
4.2	Atividade antifúngica	25
4.3	Indução de mecanismos bioquímicos	27
4.4	Mecanismos estruturais.....	34
5	CONCLUSÕES	37
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
7	APÊNDICE	50

RESUMO

ITAKO, Adriana Terumi. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro, 2008. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e na ativação de mecanismos de defesa em tomateiro.** Professora Orientadora: Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria solani* e na indução de mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência. *In vitro* avaliou-se o crescimento micelial e a esporulação do fungo. Plantas de tomate foram tratadas preventivamente (72 h antes) com óleo essencial nas concentrações 0, 250, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e discos foliares foram coletados 0, 12, 24 e 48h após a inoculação para determinar a atividades de peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase. O tempo 48 h serviu também para avaliar a germinação e formação de apressórios, assim como a formação de mecanismos estruturais. Os resultados *in vitro* revelaram a atividade fungitóxica direta, porém, *in vivo* o óleo essencial não teve efeito tóxico aos conídios nas concentrações testadas. A atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidases teve aumento significativo tanto de forma local como sistêmica e a enzima β -1,3 glucanase teve aumento significativo somente de forma local, nas maiores concentrações do óleo essencial e no tempo de coleta 48 h. A análise das epidermes revelou a ocorrência de papilas e lignificação de células epidérmicas na concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$. Com os resultados observados, pode-se verificar que o óleo essencial de *C. citratus* possui potencial como indutor de resistência em tomateiro.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, proteínas relacionadas à patogênese, papila.

ABSTRACT

ITAKO, Adriana Terumi. Universidade Estadual de Maringá, February, 2008. **Essential oil of *Cymbopogon citratus* in development of *Alternaria solani*: and in induced resistance mechanisms in tomato.** Adviser: Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

This study had the objective of evaluating the effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* *in vitro* and *in vivo* in development of *Alternaria solani* and in induced biochemical and structural resistance mechanisms. *In vitro* were evaluated the micelial growth and sporulation. Tomato plants were preventively treated (72 hours before inoculation) with essential oil in 0, 250, 500, 750, 1000 and 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ concentrations. To determinate peroxidase, polyphenoloxidase and β -1,3 glucanase activity, leaves discs were collected 0, 12, 24 and 48 h after inoculation. The 48 h time was also used to evaluate germination, apressory formation and structural resistance mechanisms formation. *In vitro* results showed direct toxic activities, however, in *in vivo* conditions, the essential oil had no fungitoxic effect on spores in tested conditions. The peroxidase and polyphenoloxidase activity showed enhance local and systemicly. The β -1,3 glucanase activity showed enhance only in local leaves in higher concentrations in 48 h. The epidermal analysis demonstrated papillas occurrence and cell lignification in 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ concentration. These results conclude that essential oils of *C. citratus* have potential of resistance induction in tomato plants.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, pathogenesis-related proteins, papilla.

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é amplamente cultivado em nosso país e apresenta grande importância comercial, tanto para o consumo *in natura* quanto para industrialização. A pinta preta, causada por *Alternaria solani*, é uma das mais importantes e freqüentes doenças fúngicas da cultura do tomateiro no Brasil. Atualmente, o pequeno número de cultivares com resistência genética a essa doença, associado ao alto custo de suas sementes, determinam medidas de controle basicamente com produtos químicos para as variedades tradicionalmente cultivadas, que são suscetíveis ao patógeno.

As utilizações de fungicidas químicos sintéticos têm demonstrado sucesso no controle de várias doenças. No entanto, seu uso indiscriminado tem levado ao desenvolvimento de resistência aos fungicidas pelos patógenos e, principalmente, a poluição ambiental, gerando risco à saúde humana e animal. Outras opções para o controle de doenças estão disponíveis, tais como uso de cultivares resistentes, controle biológico e rotação de cultura. Um dos métodos atualmente estudado é a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas, conhecida como indução de resistência.

A indução de resistência ocorre quando um agente indutor ativa rotas de sinalização na planta que responde com a produção e/ou ativação de mecanismos latentes de defesa. Os mecanismos podem ser estruturais, como lignificação, formação de papilas e halos, ou respostas bioquímicas, como acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a patogênese, como as peroxidases, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanases e quitinases.

Pesquisas têm sido desenvolvidas tentando demonstrar não somente o efeito da indução de resistência às doenças nas plantas, mas também, para elucidar o mecanismo envolvido nessa indução, uma vez que se trata de um sistema multicomponente e, por essa razão, bastante complexo. Este sistema é ativado por moléculas ou substâncias denominadas elicitores. Os elicitores podem ser tanto de origem abiótica quanto biótica como fragmentos de paredes celulares de microrganismos, rizobactérias promotoras de crescimento, algas, extratos aquosos de cogumelos, óleos essenciais e extratos de plantas medicinais.

As plantas medicinais, por apresentar uma riqueza bioquímica e por possuírem princípios ativos microbicidas, tornam-se fontes potenciais de moléculas

que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos. A planta medicinal *Cymbopogon citratus* pode ser enquadrada neste contexto devido às suas características antimicrobianas.

O controle da pinta preta em tomateiro com o uso de óleo essencial de *C. citratus* já foi relatado, porém não foi demonstrada a atividade específica do óleo essencial na indução dos mecanismos de defesa. Assim o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial do óleo essencial de *C. citratus* no desenvolvimento *in vitro* de *Alternaria solani* e como um indutor de resistência, através da avaliação dos mecanismos bioquímicos (peroxidases, polifenoloxidasas e β -1,3-glucanases) e estruturais (papilas, halos e lignificação) em plantas de tomateiro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da cultura do tomateiro

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma planta pertencente à família das solanáceas. Seu cultivo é amplamente difundido no Brasil, e apresenta grande importância comercial, tanto para o consumo *in natura* quanto para industrialização (FILGUEIRA, 2003; ALVARENGA, 2004). É a segunda olerícola mais cultivada no mundo, apenas superada pela cultura da batata (FILGUEIRA, 2003). O cultivo do tomateiro exige alto nível tecnológico e intensa utilização de mão-de-obra, o que confere a esta cultura elevada importância econômica e social (LOPEZ *et al.*, 2000; EMBRAPA Hortaliças, 2007), além de ser uma cultura onde mais de 100 doenças já foram relatadas, provocando diferentes níveis de redução de produtividade ou de qualidade do produto comercial. Entre essas doenças uma das principais é a pinta-preta, causada por *Alternaria solani* (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

2.2 Aspectos gerais da doença pinta preta

A pinta-preta, quando estabelecida em um cultivo comercial de tomateiro, causa grandes prejuízos econômicos devido à agressividade com que se desenvolve, prejudicando a qualidade dos frutos e, conseqüentemente, o rendimento da lavoura (JONES *et al.*, 1993; ALVARENGA, 2004). A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos do tomateiro causando danos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

Na folha, a doença caracteriza-se pela presença de manchas escuras e com anéis concêntricos. O ataque severo provoca desfolha acentuada e expõe os frutos à queimadura provocada pelo sol. Também é comum o aparecimento de cancro nas hastes e no colo. Nesse caso, o sintoma é caracterizado por lesões grandes, com anéis concêntricos, semelhantes às que ocorrem nas folhas. Nos frutos, verifica-se uma podridão deprimida, grande, circular, próxima ao pedúnculo, coberta por um mofo preto na superfície. Quando a doença não é controlada adequadamente, há severa destruição da área foliar (MAFFIA *et al.*, 1980; LOPES *et al.*, 2000).

2.3 Agente causal: *Alternaria solani*

O fungo *Alternaria solani* (Ellis & Martin) L.R. Jones & Grout, pertence ao grupo dos Fungos Mitospóricos, classe Hyphomycetes, ordem Hyphalis (AGRIOS, 2005). Possui micélio septado e ramificado. Os conidióforos possuem 12-20 x 120-296 µm, são simples, septados, longos, sub-hialinos a escuros, com conídios terminais. Estes são multicelulares, com septos transversais e longitudinais, clavados, com uma das extremidades pontiagudas, com ou sem apêndice (ROTEM, 1994; KUROZAWA e PAVAN, 2005).

Havendo umidade e calor suficiente o fungo penetra diretamente através da cutícula ou através de estômatos após a formação de apressório. As lesões tornam-se visíveis sob condições favoráveis entre 2 a 5 dias após a inoculação (KUROZAWA e PAVAN, 2005). A ocorrência de epidemias severas desse patógeno está associada a temperaturas diárias de 25 a 32°C. Segundo ROTEM (1994) as temperaturas mínimas, ótimas e máximas necessárias para a germinação dos conídios de *A. solani* são 5, 27 e 32 °C, respectivamente.

O fungo é disseminado facilmente pelo vento e pode sobreviver entre um cultivo e outro em restos de culturas infectados, podendo ainda sobreviver em equipamentos agrícolas, estacas e caixas usadas para o transporte dos frutos. Além do tomateiro, *A. solani* infecta outras solanáceas, como a batata, berinjela, pimentão e jiló (VALE *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2003; ALVARENGA, 2004; KUROZAWA e PAVAN, 2005; EMBRAPA Hortaliças, 2007).

2.4 Controle da pinta preta

O controle químico da doença é realizado preventivamente pela pulverização de fungicidas protetores na parte aérea de plantas de tomate, tais como mancozeb, iprodione, clorotalonil e cúpricos. Entretanto, esta prática tem baixa eficiência durante as estações úmidas e chuvosas, quando a doença é mais severa. Os fungicidas possuem bom desempenho no controle, mas alguns têm apresentado problemas de fitotoxidez em maiores doses ou quando aplicados com frequência (ALVARENGA, 2004).

Métodos culturais de controle como escolha de local, época de plantio, espaçamento adequado à boa aeração da cultura, destruição de restos culturais, rotação de cultura, adubação equilibrada e tratamento de sementes, têm significativo papel na redução do inóculo inicial (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

O uso de cultivares resistentes é o mais recomendado, no entanto, há carência de variedades de tomateiros resistentes com boas características agronômicas, além do que a maioria dessas variedades não são adaptadas a todas as regiões de cultivo e o custo das sementes é relativamente elevado (ARAÚJO e MATSUOKA, 2004; CHAERANI e VOORRIPS, 2006, EMBRAPA Hortaliças, 2007).

O controle com uso de fungicidas é hoje o método mais utilizado pelos agricultores, no entanto isso eleva o custo de produção da cultura, além de causar efeitos nocivos ao homem e ao meio ambiente. Desse modo, cresce o interesse dos produtores por formas alternativas de controle de doenças como a indução de resistência pelo uso de extratos e óleos essenciais de plantas de modo a reduzir os resíduos deixados por produtos químicos e a poluição ambiental (PIGNONI e CARNEIRO, 2005; KIMATI, 1995).

2.5 Indução de resistência

A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade deste em seus tecidos. As plantas podem se defender dos agentes fitopatogênicos de forma passiva ou ativa. Os mecanismos de resistência são geralmente subdivididos em duas categorias: pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis) (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Os mecanismos pré-formados são representados pela presença de estruturas físicas como cutículas, tricomas, estômatos e fibras/vasos condutores além de substâncias como fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos e fototoxinas. Nos mecanismos de defesa pós-formados há a formação de estruturas físicas como papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses, e produção de substâncias como fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (β -1,3 glucanases e quitinases degradadoras da parede celular dos fungos) (PASCHOLATI e LEITE, 1995; AGRIOS 2005).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos chamados elicitores (HAMMERSCHMIDT e DANN, 1997). Os elicitores são capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas,

oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra não existir uma característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN *et al.*, 1999).

A indução de resistência pode ter proteção local, nos tecidos tratados com o indutor, como também uma proteção sistêmica, que se manifesta a distância do local de aplicação do indutor (MORAES, 1992). Uma das vantagens de se estimular à resistência é que a planta, uma vez imunizada, tem seus mecanismos de defesa ativados por um longo período de tempo, geralmente até o florescimento, diminuindo desta forma, a necessidade de outras aplicações para o controle efetivo da doença (PASCHOLATI e LEITE; 1995; AGRIOS, 2005).

Mecanismos induzidos de defesa incluem modificações da parede celular (lignificação, formação de papilas e halos), produção de fitoalexinas, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e a ativação da reação de hipersensibilidade (VAN LOON, 1997; HAMMERSCHMIDT, 1999).

Lignificação tem sido observada em muitas espécies vegetais após a infecção com um outro organismo patogênico e é apontada como um importante mecanismo para resistência induzida (VANCE *et al.*, 1980). O fortalecimento da parede celular vegetal sob infecção pode ocorrer ainda pela deposição de materiais, como calose, silício e outros materiais fluorescentes, como também pelo entrecruzamento de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, catalisado por peroxidases (BRADLEY *et al.*, 1992). Todas essas alterações na estrutura da parede celular vegetal após a infecção podem contribuir para a resistência, seja por bloquear diretamente o ingresso (a entrada) do patógeno ou por atrasar o processo de penetração, permitindo à planta ativar outros mecanismos de defesa. A formação de barreiras celulares localizadas depende da habilidade da célula vegetal em acumular uma massa de citoplasma, denominada de agregado citoplasmático, no sítio de ataque do patógeno, como na formação de halos, papilas e lignificação de células (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

A reação de hipersensibilidade é um dos mais eficientes mecanismos, pois induz a produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes de planta (GRAHAM e GRAHAM, 1991). Essas proteínas incluem proteínas estruturais que quando incorporadas à matriz extracelular têm por finalidade o confinamento do patógeno (glicoproteínas ricas em glicina e enzimas peroxidases envolvidas na lignificação), enzimas do metabolismo secundário, como as envolvidas na biossíntese de antibióticos, e as proteínas relacionadas à patogênese,

responsáveis pelas maiorias das mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) são definidas como proteínas vegetais que se acumulam após o ataque por um patógeno ou situações relacionadas, como o tratamento com certos produtos químicos e outros tipos de estresses (VAN LOON *et al.*, 1994; PASCHOLATI e LEITE, 1995). São identificadas em pelo menos nove famílias de plantas, sendo melhor caracterizadas as que ocorrem em plantas de fumo e tomate. Compreendem-se em quatro famílias de quitinases (RP-3, 4, 8 e 11), uma β -1,3 glucanases (RP-2), uma de inibidores de proteinases (RP-6), uma de peroxidase (RP-9), a família de RP-1 com propriedades bioquímicas desconhecidas, e a família RP-5 semelhante à taumatina. Nem todas as famílias são representadas em toda espécie vegetal, mas cada família pode compreender diversos membros. Algumas das proteínas-RP possuem atividade antipatogênica, pela ação nas paredes celulares do patógeno invasor (VAN LOON, 1997).

Vários agentes podem induzir a produção de “sinais” no vegetal, permitindo a referida “ligação” e disparando reações que culminarão em produção duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (RESENDE *et al.*, 2002). A ativação dos mecanismos de defesa pode ocorrer a partir da elicitação por preparações de leveduras (PASCHOLATI, 1998; STADNIK e BETTIOL, 2000; LABANCA, 2002), fungos promotores de crescimento (MADI e KATAN, 1998; KOIKE *et al.*, 2001), rizobactérias promotoras de crescimento (ROMEIRO e KIMURA, 1997; HANADA e ROMEIRO, 1998; MURPHY *et al.*, 2000); compostos presentes em extratos de plantas (STANGARLIN, *et al.*, 1999; BETTIOL e STADNIK, 2001; KAGALE *et al.*, 2004; CHAKRABORTY *et al.*, 2005), elicitores químicos, como acibenzolar-S-metil (ASM) (CAVALCANTI, 2000; RESENDE *et al.*, 2002, IRITI e FAORO, 2003; ZAVAREH e TEHRANI, 2005), ácido salicílico (AS) (CAMPOS *et al.*, 2004; BESSER *et al.*, 2000); ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGNWN *et al.*, 1996; DANN *et al.*, 1998); ácido beta-aminobutírico (BABA) (RODRIGUES, A. *et al.* 2006); ácido jasmônico (CIPOLLINI, 2002) e metil jasmonato (VAN DAM e BALDWIN, 2001).

Após o desenvolvimento do éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiíco (Acibenzolar-S-Metil ou ASM), observou-se um considerável avanço na indução de resistência. Desde então, vários outros produtos estão surgindo, explorando a capacidade de ativação de diferentes mecanismos de defesa nas

plantas, tais como Messenger®, Oryzemat®, Elexa®, Oxycom® e Phtogard®. Estes são alguns representantes de uma geração de defensivos agrícolas, com grandes possibilidades de emprego em um programa racional e eficiente de manejo de doenças de plantas (SOBRINHO *et al.*, 2005).

2.6 Enzimas envolvidas na indução de resistência

2.6.1 Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

A enzima peroxidase está presente nos tecidos das plantas, em certas células animais e de microrganismos, e é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (HOAGLAND, 1990, HIRAGA *et al.*, 2001). Em plantas, esta catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), originando lignina. Participa também da biossíntese do hormônio vegetal etileno (ISIGHE *et al.*, 1993) e da oxidação de compostos fenólicos, os quais se acumulam em resposta à infecção (FRY, 1986; INTAPRUK *et al.*, 1994).

As peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 KDa, conhecidas como enzimas de “função dupla”, pois são capazes de produzir o H₂O₂ que lhes servirá de substrato. Danos na membrana plasmática da célula, causados por rupturas mecânicas ou ação de enzimas proteolíticas ativam as peroxidases que são proteínas de membrana (REIMMANN *et al.*, 1992). Possuem grande afinidade por paredes e outros componentes celulares, podendo, durante o processo de lignificação, ficar aderidas à parede celular ou à membrana envolvida na síntese de lignina. A lignina, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração fúngica (VANCE *et al.*, 1980).

A expressão das peroxidases também está correlacionada com a ocorrência de infecção por patógenos. O papel destas no processo de defesa além de reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (VANCE *et al.*, 1980; FRY, 1986; BOWLES, 1990) está no aumento na produção de EAO (espécies ativas de oxigênio) que apresentam ação antimicrobiana, bem como na sinalização (BOLWELL, *et al.*, 1995; WOJTASZEK, 1997; KAWANO e MUTO, 2000) e também na indução de fitoalexinas (KRISTENESEN *et al.*, 1999).

Na indução de resistência tanto com indutores bióticos quanto com abióticos, as peroxidases são estudadas devido a sua importância nos processos de defesa, e na maioria dos casos, o aumento na atividade está diretamente relacionado à redução da severidade da doença.

LABANCA (2002) relatou o aumento na atividade de peroxidases no patossistema pepino – *Colletotrichum lagenarium* quando utilizou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente indutor. Para o mesmo patossistema, DI PIERO *et al.* (2006), utilizando extrato aquoso do basidiocarpo de *Lentinula edodes* obtiveram aumento da atividade de peroxidase nas folhas correlacionada à redução da severidade da antracnose.

SILVA *et al.* (2004) observaram expressivo aumento na atividade de peroxidase em tomateiro induzido por *Bacillus cereus* (isolado de solo rizosférico) contra os patógenos *A. solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphyllium solani* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Já com indutores abióticos, no patossistema cacau-*Verticillium dahliae*, CAVALCANTI (2000) e RESENDE *et al.* (2002) observaram aumento na atividade da enzima, destacando ser essa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida, em resposta à pulverização de plântulas de cacauzeiro com ASM. IRITI e FAORO (2003) observaram aumentos significativos na atividade de peroxidase no processo de defesa do feijoeiro induzido por ASM contra *Uromyces appendiculatus*.

2.6.2 Polifenoloxidase (E.C. 1.14.18.1)

Polifenoloxidase agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas constituindo uma atividade de difenolase. São também conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases (OKO-KOTBER *et al.*, 2002). São enzimas intracelulares que ocorrem em animais, plantas, em várias espécies de bactérias e numerosos fungos (FLURKEY, 1989; WHITAKER, 1994). Nas plantas, estão geralmente distribuídas em toda sua estrutura, podendo alguns órgãos ou tecidos terem maiores concentrações. O nível pode variar em função da espécie, cultivar ou do ambiente, podendo sua expressão ser induzida por ferimentos (CONSTABEL *et al.*, 1995).

As polifenoloxidasas permanecem intracelularmente, em sua grande maioria em estado inativado, dentro dos tilacóides nos cloroplastos, separadas dos compostos fenólicos, que estão compartimentalizados nos vacúolos, mas pequena parte pode estar extracelularmente na parede celular (MAYER e HAREL, 1979). À medida que ocorre a ruptura da célula ocasionada por fermentos, ação de insetos ou patógenos, ou ainda, senescência, as polifenoloxidasas são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos (MOHAMMAD e KAZEMI, 2002; THIPYAPONG *et al.*, 2004).

No processo de defesa celular, em específico, na ação contra fitopatógenos, a enzima é liberada dos tilacóides após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas (THIPYAPONG *et al.*, 2004), que apresentam ação antimicrobiana (LIU *et al.*, 2005; MOHAMMAD e KAZEMI, 2002). As polifenoloxidasas também participam do processo de lignificação durante a invasão do patógeno (JUNG *et al.*, 2004; MOHAMMAD e KAZEMI, 2002).

Exemplos de trabalhos com indução de resistência podem ser relatados por RAMAMOORTHY *et al.*, (2002) que verificaram o aumento significativo na atividade da polifenoloxidase, juntamente com a peroxidase em plantas de tomate e pimenta depois do tratamento de sementes com diversos isolados de *Pseudomonas fluorescens* e correlacionaram este aumento com a redução em até 50% do tombamento causado por *Pythium aphanidermatum*.

PENG *et al.* (2004) induziram a atividade da polifenoloxidase 72 horas após o tratamento de pepino com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum* contra *Cladosporium cucumerinum*, reduzindo em até 70% a severidade da doença.

CAMPOS *et al.* (2004) também verificaram a correlação positiva entre as atividades da polifenoloxidase e peroxidase e resistência à antracnose em quatro cultivares de feijão tratados com ácido salicílico e com a raça delta de *Colletotrichum lindemuthianum*.

2.6.3 β -1,3 glucanase (E.C 3.2.1.39)

As β -1,3 glucanases são monômeros com massa molecular entre 25 e 35 KDa e que produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina, uma β -1,3 glucana. São enzimas que hidrolizam polímeros de β -1,3 glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são constituintes da

parede celular da maioria dos fungos (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Além, disso, β -1,3 glucanases liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como elicitores de defesa do hospedeiro (CUTT e KLESSIG, 1992).

Na indução de resistência, as β -1,3 glucanases e quitinases agem de forma conjunta. Uma pequena quantidade de β -1,3 glucanase é sintetizada e excretada para a lamela média, e com o crescimento fúngico a enzima começa a degradar o tecido da parede celular do fungo. Os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como exoelicitores, induzindo a síntese de quitinases e β -1,3 glucanases que são acumulados nos vacúolos, assim a partir do momento que o fungo penetra na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação dessas enzimas reprimindo a ação do patógeno (MAUCH e STAEHELIN, 1989).

Exemplos na indução de resistência podem ser relatadas por BINDER *et al.* (1989) que trabalhando com tomate, mostrou aumento de duas vezes na atividade de β -1,3 glucanase, quitinase e outras proteínas-RP nas folhas superiores após a infecção das inferiores com *Phytophthora infestans*. O aumento sistêmico nas proteínas foi correlacionado com indução sistêmica de resistência contra o fitopatógeno.

DANN *et al.* (1996) induziram resistência em feijoeiro com INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) na primeira folha verdadeira e observaram aumento de β -1,3 glucanase e quitinase tanto nesta folha, quanto nos primeiros e segundos trifólios da planta.

GUZZO e MARTINS (1996) obtiveram resultados promissores na indução tanto local como sistêmica das enzimas β -1,3 glucanase e peroxidase, ao realizarem pulverização no terceiro par de folhas de plantas de café com suspensão aquosa de *Bacillus thuringiensis* (Thuricide HP Sandoz) no intervalo de 4 a 25 e 11 a 25 dias e correlacionaram este efeito positivo com a proteção contra *Hemilleia vastatrix*.

DANN e DEVERALL (2000) observaram ativação das enzimas β -1,3 glucanase e peroxidase em plantas de ervilha a *Uromyces viciae-fabae*, quando as plantas foram tratadas com altas dosagens de ASM e isolados avirulentos de *Pseudomonas syringae* pv. *psie*.

CACHINERO *et al.* (2002) induziram resistência contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causador de murcha em grão-de-bico utilizando uma raça avirulenta desse patógeno, e dois isolados de *F. oxysporum* não patogênicos a esta cultura. A

pré-inoculação desses indutores promoveu um atraso de 3 a 7 dias no desenvolvimento da doença, e em contrapartida, a atividade de β -1,3 glucanase, quitinase e peroxidase foi significativamente maior para os três indutores.

RODRIGUES, A. *et al.* (2006), verificaram os efeitos dos indutores ASM e quitosana (suspensão proveniente de micélio de *Crinipellis pernicioso*) em cultivares de caupi contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* no aumento das enzimas β -1,3 glucanases e concluíram que estas enzimas contribuíram na redução da severidade da doença.

2.7 Plantas medicinais no controle de doenças e indução de resistência

Compostos secundários presentes em plantas medicinais são compostos que não são vitais às plantas, mas possuem função de proteção nas interações planta-planta (alelopatia), planta-animal (anti-herbivoria, atração de agentes polinizadores) e planta-microrganismos (patogênica). Sob este último aspecto, tais compostos poderiam participar das respostas de defesa da planta em um patossistema natural, ou seja, na planta que os produz ou em outros patossistemas, atuando como substâncias fungitóxicas semelhantes aos fungicidas sintéticos (SILVA, 1995). Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides, entre outras (DI STASI, 1996; CASTRO *et al.*, 2004).

Pesquisas desenvolvidas com extrato bruto ou óleo essencial obtidos de plantas medicinais têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de resistência, indicando a presença de compostos com características de elicitores (STANGARLIN *et al.*, 1999; SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005). Essa alternativa visa reduzir e/ou amenizar o uso de produtos químicos, haja visto que o seu uso intensivo na agricultura acarreta em uma série de problemas ambientais como a contaminação dos alimentos, solo e água; intoxicação dos agricultores/aplicadores; resistência de fitopatógenos e eliminação de microrganismos benéficos do solo (MOREIRA, 1996; PRITHIRAJ *et al.*, 1997; STADNIK e TALAMINI, 2004; SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005).

A atividade antifúngica *in vitro* de substâncias obtidas a partir de plantas medicinais tem sido comprovada por diversos autores. Como exemplos têm-se os

trabalhos de BIANCHI *et al.* (1997) com extrato de alho (*Allium sativum*) no desenvolvimento de *Pythium ultimum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*, onde verificaram que o extrato na concentração de 10 mL/L causou alterações morfológicas nas hifas de *P. ultimum* e na concentração de 100 mL L⁻¹ alterou as hifas de *C. lindemuthianum* e *R. solani*. KE-QIANG e BRUGGEN (2001), também trabalhando com extrato de alho nas concentrações de 0, 5, 1, 2, 4 e 8%, verificaram 100% de inibição na germinação de zoósporos de *Phytophthora infestans*.

Outros extratos como o de arruda (*Ruta graveolens*), carqueja (*Baccharis trimera*) e alfavaca (*Ocimum basilicum*) tiveram efeitos significativos na inibição do desenvolvimento de *Sclerotinia rofsii*, *Alternaria alternata*, *R. solani*, *Phytophthora* sp. e *C. graminicola* (STANGARLIN *et al.* 1999). RAJA e KURUCHEVE (1998) e SINGH e RAI (2000) verificaram que o extrato de cúrcuma inibiu o crescimento micelial de *Fusarium udum* (Berk.) Wollenw e a germinação *in vitro* de escleródios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, respectivamente. ROZWALKA (2003) verificou que o EBA (extrato bruto aquoso) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) reduziu 67% e 47,49% o crescimento micelial dos fungos *Glomerella cingulata* e de *Colletotrichum gloeosporioides*, respectivamente.

Os óleos essenciais (OE) também exibem atividade antifúngica. SINGH *et al.* (1980), avaliando o óleo essencial de *Cymbopogon martini*, *C. oliveri*, *C. citratus*, *Trachyspermum ammi* e *Ocimum kelmendescherium*, na concentração de 1%, encontraram eficiência contra o fungo *Helminthosporium oryzae* sendo mais promissor que alguns fungicidas sintéticos recomendados.

ZAMBONELLI *et al.* (1996) verificaram que os OE de *Thymus vulgaris*, *Lavandula* sp. e *Mentha piperita* se mostraram inibidores do crescimento micelial de *C. lindemuthianum* e *P. ultimum*. FIORI *et al.* (2000), avaliando os OE de *C. citratus*, *Eucalyptus citriodora* e *Ageratum conizoides* verificaram que os mesmos inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Dydimella bryoniae* agente causal da podridão gomosa em melão.

DHINGRA *et al.* (2004) verificaram a eficiência do OE extraído de sementes de mostarda (*Brassica rapa*) na supressão do crescimento *in vitro* de *R. solani* a partir da concentração de 50 mL L⁻¹. SILVA e BASTOS (2007), verificaram que os OE de *Piper calossum*, *P. marginatum* var. *anisatum* e *P. enckea* inibiram o

crescimento micelial e a germinação de basidiósporos de *C. pernicioso* e o crescimento micelial de *Phytophthora palmivora* e *P. capsici*

PEREIRA *et al.* (2006) avaliaram os OE de alecrim (*R. officinalis*), cebola (*Allium cepa*), alfavaca (*O. basilicum*), menta (*M. piperita* L.) e orégano (*Origanum vulgare*) sobre o desenvolvimento de *Fusarium* sp., *Aspergillus ochrace*; *A. flavus* e *A. niger* e verificaram que OE de orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados em todas as concentrações exceto o fungo *A. niger*. Os óleos de alecrim, menta, cebola e alfavaca reduziram o crescimento micelial a partir da concentração de 1500 mg mL⁻¹. SALGADO *et al.* (2003) trabalhando com os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* na concentração de 500 mg kg⁻¹, observaram inibição significativa no desenvolvimento de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*.

MEDICE *et al.* (2007) constataram que os óleos de *Corymbia citriodora*, *Cymbopogon nardus*, *Azadirachta indica* e *Thymus vulgaris* tiveram efeito sobre a germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* inibindo em 100% a germinação.

No controle dos fitopatógenos *in vivo* os extratos aquosos têm sido utilizados e apresentam resultados promissores para diferentes culturas. Dentre estes podem-se citar o uso de extrato de rizomas frescos de gengibre (*Zingiber officinale*) contra o oídio em ervilha, diminuindo em até 50% a severidade da doença (SINGH *et al.*, 1991). RODRIGUES, E. *et al* (2007) também verificaram o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em alface utilizando o extrato de gengibre.

O extrato de cavalinha (*Equisetum* sp.) reduziu o número de lesões provocadas pela requeima (*P. infestans*) em batata quando aplicado a 4% um dia antes da inoculação com o patógeno (KE-QIANG e BRUGGEN, 2001).

O extrato aquoso de cânfora (*Artemisia camphorata*) promoveu a redução do tamanho das lesões, em até 29% e também o número de lesões em até 60% da doença mancha marrom do trigo, causada por *Bipolaris sorokiniana* (FRANZENER *et al.*, 2003).

O controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor pela tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) foi observado no trabalho de VIGO SCHULTZ *et al.* (2006). Já o extrato de cúrcuma mostrou-se eficiente no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Bondar em mandioca (KUHN *et al.*, 2006).

Extratos de *Corymbia citriodora* (eucalipto) mostraram-se eficiente no controle de *Helminthosporium* sp. em fibras de bananeira quando tratadas preventivamente (RODRIGUES, E. *et al.*, 2006). O óleo obtido de neem (*Azadirachta indica*) mostrou eficiência no controle de antracnose (*C. lindemuthianum*) em feijoeiro, porem não foi eficiente no controle da pinta-preta (*A. solani*) em tomateiro (PIGNONI e CARNEIRO, 2005).

Em específico no patossistema tomate - *A. solani* há o trabalho de MONTES-BELMONT e GARCIA-LICONA (1997), em que os autores verificaram a eficiência da infusão de folhas secas de 50 espécies de várias plantas sobre o fitopatógeno, observando que os extratos de *A. sativum*, *Teloxys ambrosioides* e *Tagetes erecta* L. reduziram a severidade em relação ao tratamento com o fungicida.

O trabalho de BALBI-PEÑA *et al.* (2006b) mostrou a eficiência do extrato cúrcuma (*Curcuma longa*) a 1% e 10% no controle de pinta preta causada por *A. solani* em tomateiro Bônus F1, sendo a eficiência similar ao tratamento com fungicida oxiclóreto de cobre (1.100 mg do i.a. L⁻¹), mas inferior ao fungicida azoxystrobin (80 mg do i.a. L⁻¹). Já BAPTISTA *et al.* (2007) avaliaram o efeito dos extratos de neem (*A. indica*), alho+pimenta, primavera (*Bougainvillea spectabilis*) e verificaram que os extratos foram eficientes na redução da severidade da doença pinta-preta.

Já trabalhos com indução de resistência têm-se os resultados obtidos por CHAKRABORTY *et al.*, (2005) que observaram aumento das enzimas β -1,3 glucanase e quitinase em plantas de chá depois de induzidas com extrato de neem (*A. indica*) e de *Catharanthus roseus* e associou o aumento dessas enzimas com a redução de severidade da doença provocada por *Curvularia pallescens*.

CAVALCANTI *et al.* (2006) verificaram proteção contra *X. campestris* pv. *vesicatoria* em plantas de tomateiro depois de tratadas com extrato aquoso de ramos de laboeira (*Solanum lycocarpum*); ASM, Ecolife® (formulação biológica proveniente de biomassa cítrica) e suspensão de quitosana e correlacionaram esta proteção ao aumento das proteínas β -1,3-glucanase e quitinase.

RESENDE *et al.*, (2007), estudando uma seleção de extratos vegetais, verificaram que extrato aquoso e fervido de laboeira (*S. lycocarpum*) também conferiu redução da severidade da doença vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacaueteiro (*Theobroma cacao*) e correlacionou com o aumento atividade de

peroxidase e outras proteínas relacionadas à patogênese (quitinase e β -1,3 glucanase).

2.8 *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos

Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf é conhecido popularmente no Brasil como capim-limão, erva cidreira, capim cidreira, capim-santo ou capim cidró. É uma espécie que pertence a família das Poaceae. É originária da Índia e seu cultivo é descrito em toda a faixa dos trópicos. Possui aroma forte e penetrante, semelhantes ao de limão (CORREA, *et al.*, 1994). A planta sempre foi muito utilizada pela população devido a seu efeito analgésico e calmante. O óleo essencial desta espécie é utilizado mundialmente como componente aromático em indústria de cosméticos e perfumarias e é um dos óleos essenciais mais importantes e comercializados (QUEIROZ, 1993; MING *et al.*, 1996).

O principal componente do óleo essencial é o citral, que é uma mistura de isômeros, conhecida como citral A ou isômero E (geranial) e citral B ou isômero Z (neral). Como componentes de maior ocorrência além do citral estão o mirceno, limoneno, nonanal, nerol, geraniol, linalol e terpineol (EL FATTAH *et al.*, 1992; BERTINI *et al.*, 2005). O citral possui atividade germicida reconhecida contra cerca de 20 microrganismos, sendo usado como larvicida, repelente de insetos e exibe propriedades antifúngicas (MING *et al.*, 1996; PARANAGAMA *et al.*, 2003). Porém, segundo OHNO *et al.* (2003) é necessário examinar separadamente cada componente do óleo essencial e sua combinação para averiguar se eles têm ação bactericida/antifúngica sozinhos ou sincronizados.

Devido a suas características antimicrobianas a aplicação de *C. citratus* como opção no controle fitossanitário vem sendo estudada em vários trabalhos tanto como na forma de óleo como de extrato bruto. Trabalhos com aplicação de extrato de *C. citratus*, em pós-colheita de repolho, mostraram o controle total da podridão mole causada pela *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (ACEDO, 1999).

O extrato de *C. citratus* a 10% inibiu completamente o crescimento *in vitro* dos fitopatógenos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* causadores de podridão radiculares em feijoeiro (VALARINI *et al.*, 1994).

FIORI *et al.* (2000) trabalhando com os extratos brutos de *C. citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conizoides* e *Achillea millefolium* verificaram que

todos os extratos foram eficientes em inibir o crescimento micelial, esporulação e germinação de *Didymella bryoniae*.

BALDO *et al.* (2005) trabalhando com os extratos brutos de *C. citratus* e *C. nardus* no desenvolvimento *in vitro* de *Cladosporium fulvum* do tomateiro verificaram a fungitoxidade em todos os parâmetros avaliados, com média de inibição de 77% para a massa micelial, 71% para esporulação e 24% para germinação de esporos.

Em trabalhos utilizando o óleo essencial de *C. citratus* MISHRA e DUBEY (1994) observaram a efetividade contra germinação dos conídios e crescimento radial dos fungos *Fusarium moniliforme*, *A. flavus* e *Aspergillus fumigatus*, nas concentrações de 800, 1000 e 1200 ppm. ADEGOKE e ADESOLA (1996) também observaram o efeito do óleo essencial de *C. citratus* sobre os fungos *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Macrophomina phaseoli*, *Penicillium*, e algumas bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginos*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), agentes de biodeterioração de milho e caupi armazenados.

Para o fungo *A. solani*, SORNBERGER (2005) utilizou os extratos aquosos de *C. citratus* e *C. nardus* e verificou que não houve inibição no desenvolvimento do fungo *in vitro*, tanto no crescimento micelial quanto na esporulação. Já ABREU (2006) verificou a eficiência do óleo de *C. citratus* no desenvolvimento *in vitro* de *A. solani* e no controle da doença pinta preta, em ambiente protegido, com aplicações sistemáticas a cada 3 dias do óleo essencial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Maringá no laboratório de Biotecnologia Agrícola (Bloco T33) da Universidade Estadual de Maringá-UEM.

O isolado de *A. solani* utilizados nos experimentos foi fornecido pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE - Marechal Candido Rondon). O fungo foi mantido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) em câmara incubadora, com temperatura de 25±2°C e escuro.

Para obtenção do óleo, folhas de *C. citratus* foram coletadas no horto de Plantas Medicinais pertencente ao Departamento de Agronomia – UEM. O óleo essencial foi obtido pelo método de destilação por arraste a vapor (COSTA, 1986), e armazenado em frascos escuros e mantido em geladeira.

3.1 Sensibilidade de plantas de tomateiro ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Este pré-ensaio foi realizado a fim de avaliar se óleo de *C. citratus* causa algum tipo de fitotoxidez em plantas de tomateiro. Sementes da cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células. Aos 30 dias após a semeadura as mudas foram transferidas para vasos de 500 mL que continham substrato Plantmax® adubado com o fertilizante PG mix (50g/saco de substrato).

As plantas receberam 15 dias após o transplântio, os tratamentos nas seguintes concentrações: 0, 500, 1000, 2000, 3500, 5000, 7500 e 10000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de *C. citratus*. Adicionou-se espalhante Tween 20® na proporção de 1:1. Foram realizadas aplicações semanais por um período de quatro semanas, totalizando quatro aplicações. Foram avaliadas a altura da planta, número de folhas, massa fresca e massa seca da parte aérea. A massa seca da parte aérea foi obtida mantendo a planta por 48 horas a 60°C em estufa ventilada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos e quatro repetições, totalizando 32 parcelas. A parcela foi constituída por um vaso com uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância e em seguida, procedeu-se a análise de regressão ($p \leq 0,05$), utilizando os pacotes estatísticos SAS/Stat e Sisvar.

3.2 Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*

Para avaliação *in vitro*, o óleo essencial foi esterilizado pelo método de filtração em membrana Millipore (diâmetro do poro 0,45 µm). Alíquotas de 0, 5, 10, 20, 40 e 50 µL do óleo essencial de *C. citratus* foram adicionados ao meio BDA autoclavado fundente e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, um disco de micélio (8 mm de diâmetro) de *A. solani*, com 15 dias de idade, foi repicado para o centro de cada placa, que foram vedadas com filme plástico e incubadas a 25°C ± 2°C no escuro.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada através de medições diárias do diâmetro das colônias, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, iniciando-se 24 horas após a instalação do experimento e perdurou até o momento em que as colônias fúngicas no tratamento controle cobrissem 2/3 da superfície do meio de cultura.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial foi utilizada a fórmula descrita por BASTOS (1997).

$$PIC = \frac{\text{cresc. test} - \text{cresc. trat}}{\text{cresc. test}} \times 100$$

Em que,

cresc.test = crescimento micelial da testemunha (cm);

cresc.trat = crescimento micelial dos tratamentos (cm).

Para a contagem de esporos, foram adicionados 10 mL de água destilada em cada placa, o micélio foi raspado e a suspensão foi filtrada em gaze. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e quatro repetições. Cada parcela foi constituída por 1 placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância, e em seguida, procedeu-se a análise de regressão ($p \leq 0,05$), utilizando os pacotes estatísticos SAS/Stat e Sisvar.

Para avaliar a atividade antifúngica *in vivo*, folhas de tomateiro da var. Santa Clara foram tratadas preventivamente (72h) antes da inoculação com *A. solani* com OE de *C. citratus* nas concentrações de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1500 µL L⁻¹.

Os discos foliares com 2 cm de diâmetro foram coletados 48h após a inoculação com *A. solani* das folhas tratadas e armazenadas em FAA (formol: ácido acético: etanol 50%; 5:5:90, v/v/v). A avaliação da germinação e formação de apressórios sobre a epiderme dos discos foliares procedeu com o clareamento dos discos foliares em etanol 95% em banho-maria a 60 °C (CONTI *et al.*, 1986). Depois de clareados em etanol, os discos foram corados com azul de algodão e examinados microscopicamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando seis concentrações do OE com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por quatro discos foliares.

3.3 Indução de resistência local e sistêmica

As sementes de tomate var. Santa Clara foram plantadas em bandejas de isopor (128 células) contendo substrato comercial Plantmax® sendo mantidas em casa-de-vegetação e irrigadas diariamente. Após 33 dias da semeadura, as plântulas foram transferidas para vasos de 500 mL que continham o mesmo substrato adubado com o fertilizante PG mix (50g/saco de substrato).

Vinte e cinco dias após o transplântio, o 2º par de folhas das plantas foram tratadas com óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$, por aspersão até o ponto de escorrimento. Após 72h da aplicação dos tratamentos, o 2ª par de folhas tratadas e o 3ª par de folhas (não tratadas) foram inoculados com *A. solani* (10^4 conídios mL^{-1}). A suspensão de conídios foi preparada com adição de 10 mL de água destilada em placa de Petri contendo *A. solani* com 15 dias de crescimento em BDA e raspando-se suavemente a colônia. A suspensão foi filtrada em gaze e a concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer. Nesta suspensão adicionou-se Tween 20 (20 μL a cada 300 mL da suspensão) antes da inoculação.

Para garantir o sucesso da inoculação artificial, as plantas foram mantidas em condições de alta umidade relativa durante 24h antes e depois da inoculação através do uso câmara úmida individual.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 6 x 4, com 24 tratamentos: seis concentrações do óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e quatro tempos de coleta: 0, 12, 24 e 48h com quatro repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância, após verificar se os pressupostos básicos foram

atendidos (homogeneidade da variância e normalidade dos erros). Em seguida, ajustou-se um modelo de superfície de resposta ($p \leq 0,05$), utilizando o pacote estatístico SAS/Stat.

3.4 Análises bioquímicas

Discos de tecido vegetal foram coletados do 2º par de folhas tratadas e do 3º par de folhas (não tratadas), nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h após a inoculação, a fim de verificar a indução de mecanismos bioquímicos na folha local e sistêmica. De cada folha foram coletados cinco disquinhos com 8 mm de diâmetro. Os discos foram pesados, acondicionados em saquinhos de papel alumínio, etiquetados e mantidos em congelador (-20°C) para posterior quantificação das enzimas.

Para obtenção do extrato enzimático os discos foliares foram homogeneizadas mecanicamente em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana na presença de 4,0 mL de tampão de acetato 100 mM (pH 5,0). O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm durante 25 min a 4°C, sendo o sobrenadante armazenado para posteriores análises a -20°C e considerado como extrato enzimático.

3.4.1 Atividade da peroxidase

A atividade da enzima peroxidase foi determinada a 30°C através do método direto espectrofotométrico, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO e PASCHOLATI, 1999). Em uma cubeta de vidro, com capacidade de 3 mL foi adicionado 2,9 mL de tampão de reação composto por 306 µL de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL guaiacol (2,0%) em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) mais 0,10 mL do extrato enzimático. O material foi mantido em banho-maria a 30°C por 2 min (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1982). As leituras foram realizadas em intervalos de 15 segundos em 15 segundos por um período de 3 min. A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica e os resultados foram expressos em $\Delta_{\text{abs}470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína.

3.4.2 Atividade da polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada pelo método de DUANGMAL e APENTEM (1999). A reação foi realizada misturando-se 900 µL do substrato e 100 µL do extrato enzimático. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0). A temperatura de reação foi de 30°C e as leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 420 nm. As

leituras foram realizadas de forma direta por um período de 3 min. Os resultados foram expressos em $\Delta_{\text{abs}}420 \text{ nm min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína.

3.4.3 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada de laminarina, por meio do uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (PAHBAH) (LEVER, 1972). A mistura da reação foi incubada a 37°C por 1 h, contendo 150 μL do extrato enzimático e 150 μL de laminarina (2,0 mg mL^{-1}) (ABELES e FOENCE, 1970). Após esse período, foi acrescentado 1,5 mL de solução de PAHBAH (0,5 g dissolvido em 20 mL de HCL 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), e em seguida essa mistura foi aquecida a 100°C por 10 min. Após o resfriamento até a temperatura de 25°C, as amostras tiveram suas absorbâncias determinadas a 410 nm, contra o tampão de extração. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para a glicose e o resultado expresso μg de glicose μg^{-1} de proteína.

3.4.4 Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais presentes no extrato foi determinada utilizando-se o método de BRADFORD (1976). Em cada 0,8 mL de amostra foram adicionados sob agitação 0,2 mL de reagente concentrado de Bradford.

Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm. Como referência foi utilizado 0,8 mL de água destilada e 0,2 mL de reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,8 mL de amostra (μg proteína 0,8 mL^{-1}), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 μg 0,8 mL^{-1} .

3.5 Avaliação dos mecanismos estruturais

Discos foliares com aproximadamente 2 cm de diâmetro foram coletadas 48 h após a inoculação com *A. solani* das folhas tratadas (72 h) com OE de *C. citratus* nas concentrações de 0, 250, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$. Depois foram armazenadas em FAA (formol: ácido acético: etanol 50%; 5:5:90, v/v/v).

Os discos foliares foram descoloridos em etanol 95% em banho-maria a 60°C (CONTI *et al.*, 1986). Depois de descoloridos em etanol, foram colocados em recipiente contendo água destilada, para a remoção do etanol e hidratação das

mesmas e em seguida, colocadas em contato com o corante azul de O-toluidina a 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8 (O'BRIAN *et al.*, 1964) e novamente colocados em água por 3 min para retirada do excesso do corante. Em seguida foram dispostos em lâminas de microscopia com glicerina a 20% e visualizados em microscópio ótico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Sensibilidade de plantas de tomateiro ao óleo

Pela análise de variância, não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade. Também procedeu-se análise de regressão e não foi possível ajustar nenhum modelo para as variáveis estudadas (Quadro 1).

Quadro 1. Altura (cm), massa fresca e seca (g) e número de folhas de plantas de tomateiro tratadas com crescentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Altura (cm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Número de folhas
0	41	11,18	1,75	7
500	39	10,27	1,69	7
1000	40	11,95	2,01	7
2000	41	10,93	1,94	7
3500	40	11,16	1,80	7
5000	41	9,353	1,52	8
7500	42	12,85	2,07	8
10000	37	9,14	1,53	7
CV (%)	7,28	27,79	25,38	15,16

No presente trabalho foi verificado que plantas de tomate não sofreram nenhum tipo de fitotoxidez quando tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *C. citratus*. Porém, há relatos de OE de outras plantas medicinais causando algum tipo de fitotoxidez. No trabalho realizado por MEDICE *et al.* (2007) com os óleos essenciais de *C. citriodora*; *C. nardus*, *A. indica* e *T. vulgaris* no controle da ferrugem asiática da soja causada por *P. pachyrhizi* foi verificado que o óleo essencial de *T. vulgaris* causou uma leve fitotoxidez, caracterizada por queimaduras nas folhas das plantas, levando a não avaliação das folhas. Já no trabalho realizado por PIGNONI e CARNEIRO (2005), utilizando o óleo de *A. indica* no controle da antracnose no feijoeiro e pinta preta no tomateiro foi verificada que o óleo a 1,0% e 1,5% provocou fitotoxidez em algumas plantas, causando encarquilhamento. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos por MARTINEZ (2002) em relação ao óleo *A. indica*. Tais resultados justificam a realização do bioensaio para evitar possíveis problemas de avaliação do óleo *C. citratus* em plantas de tomateiro.

4.2 Atividade antifúngica

Com os dados de crescimento micelial, foi realizada análise de regressão e os dados ajustaram-se a uma reta (Figura 1A). A cada aumento de 1 µl do óleo essencial ocorreu um aumento de 1,9488% na inibição do micélio do fungo, e a máxima inibição ocorreu com a maior alíquota de 50 µl. Já para os dados de inibição de esporulação (Figura 1B) a análise de regressão foi ajustada a uma equação logarítmica. A esporulação foi inibida em 100% a partir da alíquota 40 µL, ou seja, com o aumento das alíquotas, o OE não interfere mais na inibição de esporulação.

Estes resultados indicam que o óleo essencial de *C. citratus* apresenta efeito fungitóxico *in vitro* sobre o desenvolvimento do fungo *A. solani* tanto no crescimento micelial como na esporulação e corroboram com os resultados obtidos por ABREU (2006), que trabalhando com vários óleos essenciais, e principalmente com o óleo essencial *C. citratus* nas concentrações de 0, 500, 750 e 1000 µL L⁻¹ verificou inibição total no crescimento micelial na concentração acima de 750 µL L⁻¹ e inibição total da germinação dos conídios na concentração a partir 500 µL L⁻¹.

O efeito do óleo essencial de *C. citratus* na inibição de *A. solani* confere com os estudos já realizados por DEVI *et al.* (1982) no controle de *R. solani* utilizando o OE de *C. citratus*, e o mesmo efeito sobre o crescimento e inibição da germinação dos conídios dos fungos *F. moniliforme*, *A. flavus* e *A. fumigatus* (MISHRA e DUBEY, 1994). VALARINI *et al.* (1996) observaram também o efeito do óleo sobre os fungos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, sendo fungos incidentes da cultura do feijoeiro. ADEGOKE e ADESOLA (1996), observaram o efeito do OE de *C. citratus* sobre os fungos *A. flavus*, *A. fumigatus*, *M. phaseoli*, *Penicillium* sp., e de algumas bactérias (*E. coli*, *P. aeruginos*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* e *S. aureus*). Estes resultados assemelham com os obtidos por NGUEFACK *et al.* (2004) que verificaram o efeito do óleo no crescimento micelial de *A. flavus*, *A. fumigatus* e *F. moniliforme*, onde o óleo reduziu o desenvolvimento em 64%, 48% e 77%, respectivamente, na concentração a partir de 500 ppm.

Neste trabalho, o óleo *C. citratus* apresentou efeito fungitóxico *in vitro* sobre *A. solani* e isto pode ser atribuído à sensibilidade do fungo pelo contato direto com o componente de maior concentração, o citral, pois estudos já verificaram que este possui atividade germicida reconhecida contra cerca de 20 microrganismos e exhibe propriedades antifúngicas.

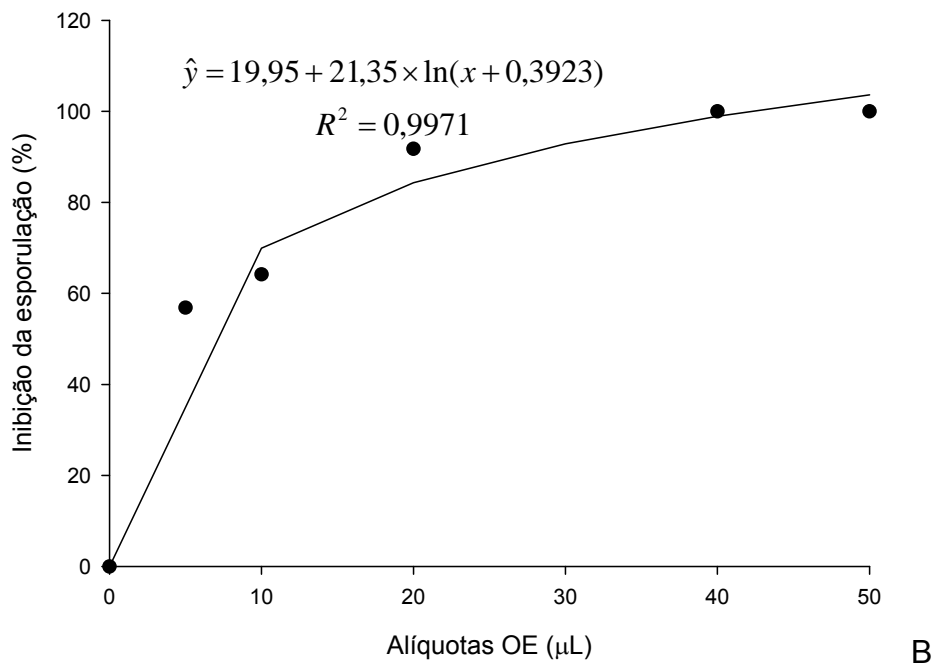
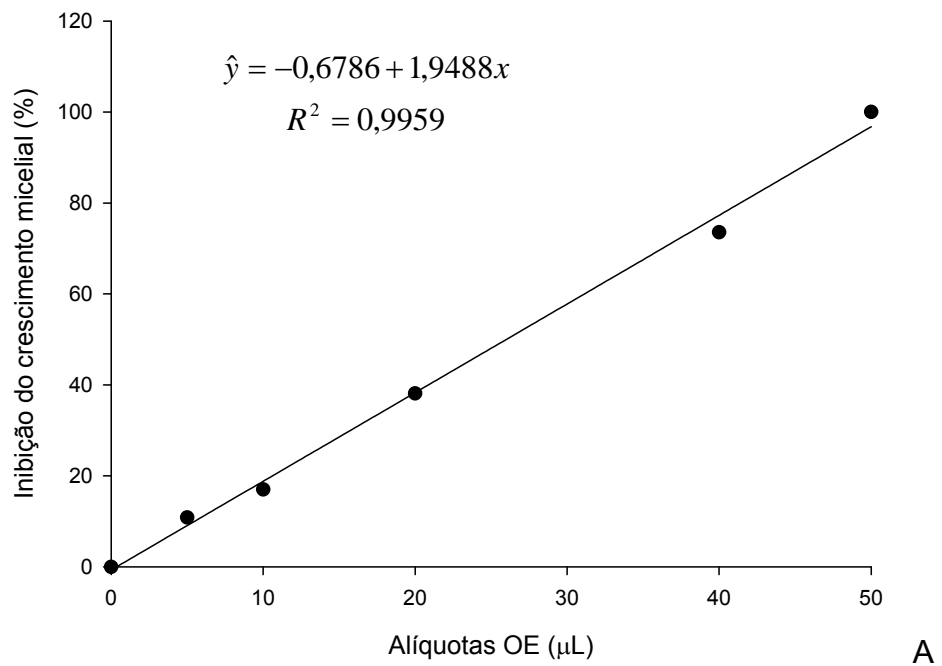


Figura 1. Inibição *in vitro* de crescimento micelial (A) e da esporulação (B) de *Alternaria solani* sob alíquotas de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Já para os resultados *in vivo*, pela análise de variância verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade. Procedeu-se também a análise de regressão e não foi possível ajustar nenhum modelo para as variáveis estudadas, ou seja, os tratamentos não interferiram na germinação e formação de apressórios (Quadro 2).

Quadro 2. Germinação (%) e formação de apressórios (%) em folhas tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e coletadas 48h após a inoculação com *Alternaria solani*

Concentração ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Germinação (%)	Apressórios (%)
0	100	100
250	95	95
500	96	96
750	98	94
1000	97	98
1500	94	95
CV (%)	12	9,5

Com esses resultados pode-se observar que o OE de *C. citratus* em condições *in vivo* não apresentou efeito fungitóxico aos conídios de *A. solani* nas concentrações testadas. SHUCK *et al.* (2001) e COSTA *et al.* (2005) afirmam que o citral é bastante volátil. A falta de efeito fungitóxico *in vivo* pode ser explicada por essa característica uma vez que o tratamento com o óleo ocorreu 72h antes da chegada do patógeno. Desse modo, é possível que tenha ocorrido à volatilização do óleo neste período de tempo (72h) ou também pode ter ocorrido à absorção deste óleo pela planta.

Os compostos químicos ou biológicos para serem considerados indutores de resistência, não devem possuir atividade inibitória direta sobre o microrganismo patogênico (KESSMAN *et al.*, 1994; KÚC, 2001). A atividade do agente indutor não ocorre em consequência da ação antimicrobiana ou de sua transformação em agentes antimicrobianos, mas sim pela sua capacidade de ativar mecanismos de defesa bioquímicos e estruturais da planta, em resposta a presença de um patógeno em potencial. O óleo essencial de *C. citratus* mostrou-se fungitóxico *in vitro*, mas esta ação foi ausente *in vivo*, visto pela análise foliar, indicando que o OE pode possuir uma das características de indutor de resistência.

Resultados diferentes aos obtidos aqui foram observados por ECKSTEIN (2005) que avaliaram o efeito indutor do EBA de cúrcuma, solução de curcumina e

ASM no mesmo patossistema. O tratamento preventivo de 72h antes da inoculação com *A. solani* evidenciou uma maior quantidade de esporos germinados nas plantas tratadas com o ASM e não levou a formação de estruturas de resistência (papilas, halos e lignificação) horas depois da inoculação. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que o ASM é um produto comercial indutor de resistência, não apresentando atividade antimicrobiana direta. No entanto, em relação ao tratamento com EBA e solução de curcumina foi observado a não germinação dos conídios sobre as epidermes foliares, concluindo que os efeitos desses tratamentos estavam limitados aos esporos do patógeno, ou seja, possuem efeito fungitóxico direto sobre o fungo, não possuindo uma das características de um indutor de resistência. Resultados esses coincidindo com os resultados *in vitro* observados por BALBI-PEÑA *et al.*, (2006a) com os mesmos tratamentos sobre *A. solani*, verificaram o efeito fungitóxico tanto na inibição do crescimento micelial quanto na esporulação e germinação dos conídios. Os mesmos autores observaram também o controle da pinta-preta em condições de casa-de-vegetação, com os mesmos tratamentos e produtividade similar ao fungicida comercial testado.

Os testes *in vitro* são importantes indicativos preliminares para verificar o potencial do produto a ser avaliado, pois quando há efeito fungitóxico direto *in vitro* não se pode descartar a hipótese de indução de resistência, pois este efeito pode não estar presente *in vivo*, como observado neste trabalho.

4.3 Indução de mecanismos bioquímicos

Para todas as variáveis, não foram violados os pressupostos básicos de homogeneidade da variância e normalidade dos erros, como pode ser observado no Apêndice A.

A aplicação preventiva do OE de *C. citratus* nas folhas de tomate provocou um aumento local (folhas tratadas) e sistêmico (folhas não tratadas) na atividade de peroxidase e polifenoloxidase, e para β -1,3-glucanase o aumento ocorreu somente de forma local (Figuras 2, 3 e 4).

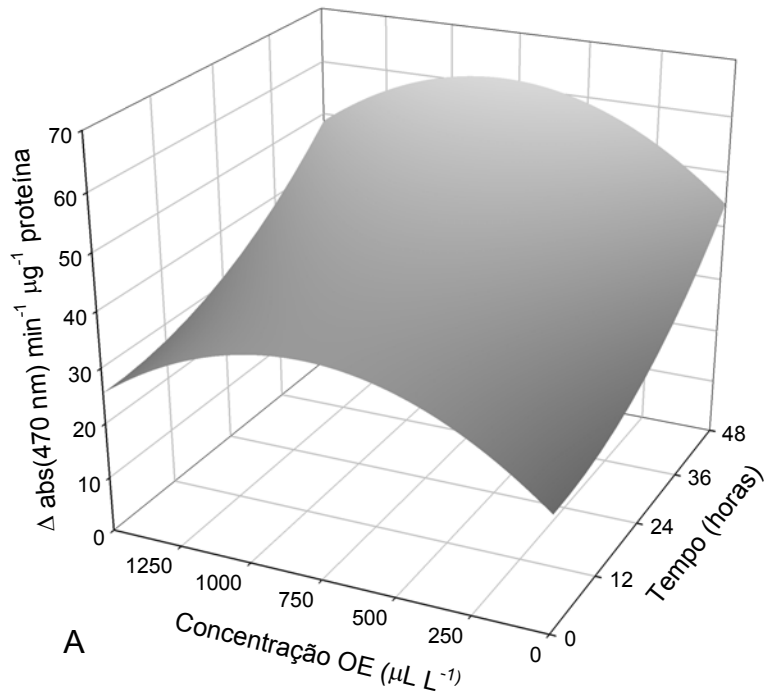
Para a atividade de peroxidase observou-se uma interação significativa entre os fatores tempo e concentração resultando em uma superfície de resposta. Segundo o modelo ajustado para a atividade local da peroxidase (Figura 2A), a resposta máxima foi obtida com uma concentração de $825 \mu\text{L L}^{-1}$ obtendo, uma atividade de $61,82 \Delta (\text{ABS } 470) \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína, 48h após a inoculação. Na

folha não-tratada segundo a superfície de resposta ajustada (Figura 2B), a resposta máxima foi obtida com uma concentração de $900 \mu\text{L L}^{-1}$ obtendo uma atividade de $85 \Delta (\text{ABS } 470) \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína no maior tempo de coleta (48h).

Para a polifenoloxidase também ocorreu uma interação significativa entre os fatores tempo e concentração resultando em uma superfície de resposta. Na folha tratada, segundo o modelo (Figura 3A), a resposta máxima seria obtida com uma concentração de $907 \mu\text{L L}^{-1}$ obtendo, uma atividade de $41,46 \Delta (\text{ABS } 420) \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína no tempo de coleta 48 h. Na folha não-tratada, segundo a superfície de resposta ajustada (Figura 3B), a resposta máxima foi obtida com a maior concentração ($1500 \mu\text{L L}^{-1}$) com uma atividade de $47,29 \Delta (\text{ABS } 420) \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de proteína, no maior tempo de coleta (48h).

Já para a atividade β -1,3 glucanase somente na folha tratada houve uma interação significativa entre a concentração e o tempo de coleta, resultando em uma superfície de resposta (Figura 4), a resposta máxima foi obtida com uma concentração de $810 \mu\text{L L}^{-1}$ e atividade de $1,12 \mu\text{g glicose } \mu\text{g}^{-1} \text{ proteína}$ no maior tempo de coleta (48h). Para a folha não tratada a análise de variância não revelou interação significativa entre os fatores concentração e tempo de coleta, verificando que não houve aumento significativo da enzima nestas condições.

$$\hat{y} = 21,078 + 0,0429conc + 0,0100tempo^2 - 0,000026conc^2$$



$$\hat{y} = 26,719 - 0,01146conc + 0,000715tempo \times conc$$

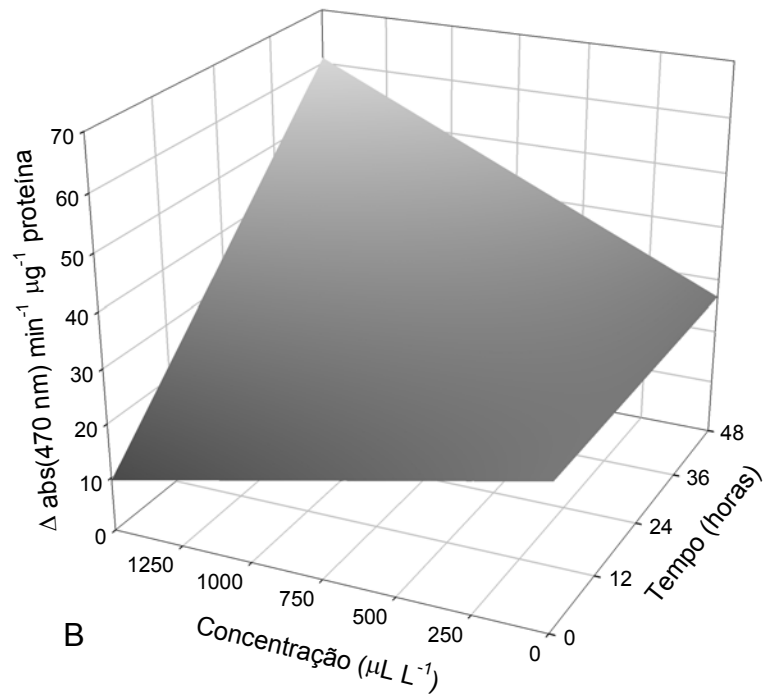
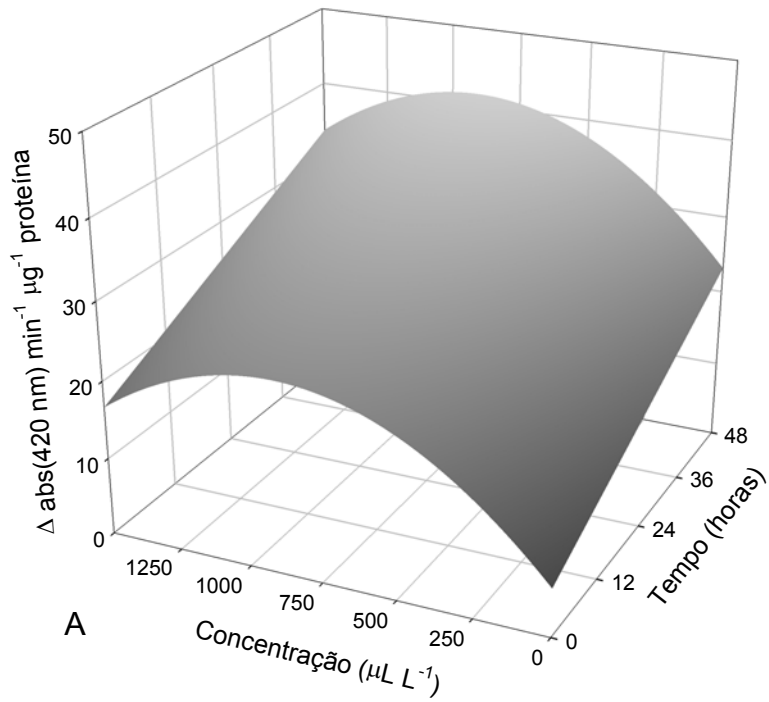


Figura 2. Atividade da enzima peroxidase em folhas de tomateiro tratadas (A) e não tratadas (B) com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* 72 h antes da inoculação com *Alternaria solani*. Amostras coletadas 0, 12, 24 e 48h após a inoculação.

$$\hat{y} = 6,2550 + 0,3525tempo + 0,0403conc - 0,0000222conc^2$$



$$\hat{y} = 9,0261 - 0,3299tempo + 0,000404tempo \times conc + 0,00495tempo$$

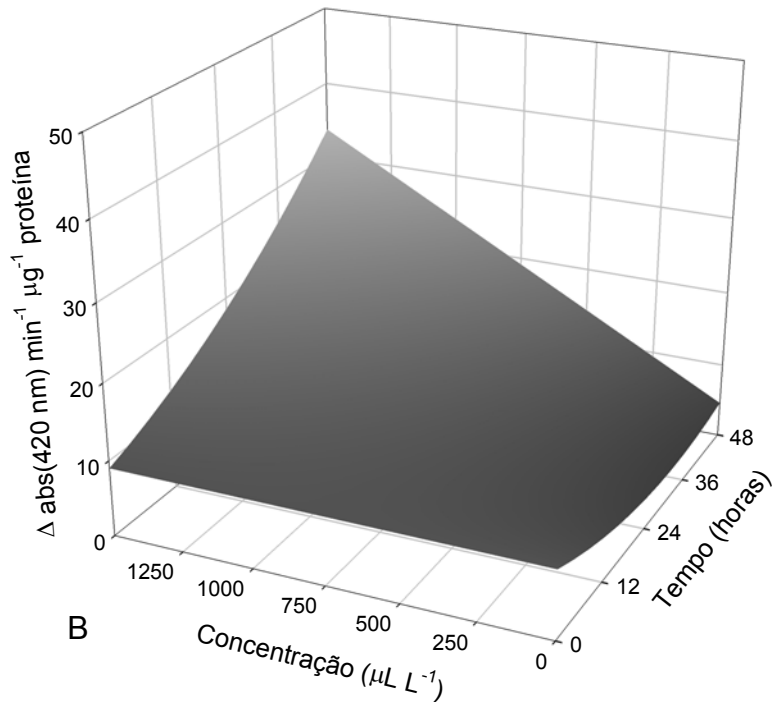


Figura 3. Atividade da enzima polifenoloxidas em folhas de tomateiro tratadas (A) e não tratadas (B) com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* 72 h antes da inoculação com *Alternaria solani*. Amostras coletadas 0, 12, 24 e 48h após a inoculação.

$$\hat{y} = 0,1915 + 0,001144conc + 0,000202tempo^2 - 0,000000706conc^2$$

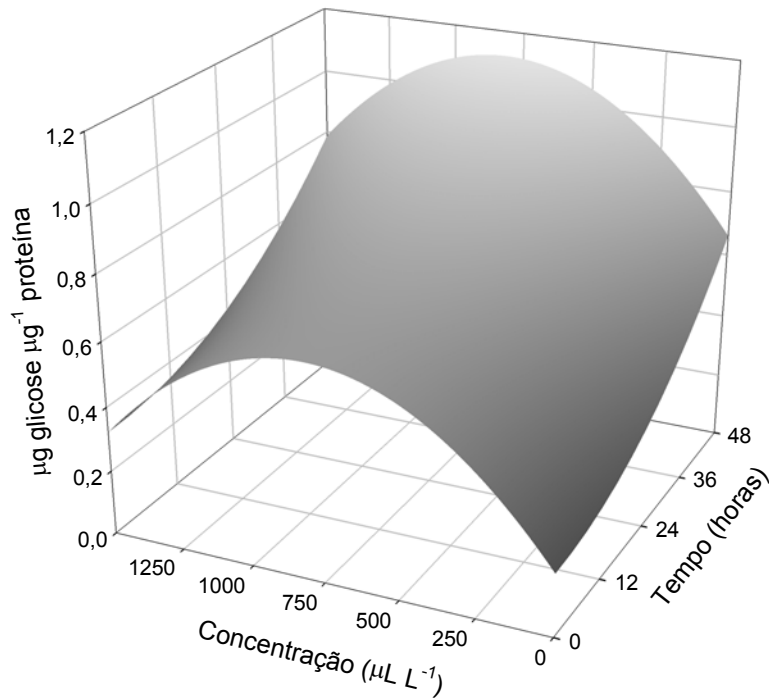


Figura 4. Atividade da enzima β -1,3 glucanase em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* 72 h antes da inoculação com *Alternaria solani*. Amostras coletadas 0, 12, 24 e 48h após a inoculação.

As enzimas relacionadas à patogênese estão envolvidas nos processos de defesa durante a infecção do patógeno, apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção de plantas. Dentre as enzimas ativadas pelos indutores encontram-se as peroxidases e polifenoloxidasas que estão envolvidas diretamente no processo de lignificação da parede celular, e por sua vez a β -1,3 glucanase que pode atuar diretamente na glucana presente na parede fúngica. Assim como apresentar um efeito indireto contra o patógeno, pela liberação de fragmentos da parede celular que vão elicitar outras respostas de defesa na planta.

Os resultados revelaram que, em termos de indução de resistência o OE de *C. citratus* ativou essas enzimas tanto de forma local como sistêmica após a inoculação com *A. solani*. Esta pode ser uma das explicações para os resultados obtidos por ABREU (2006) que verificou uma redução significativa do progresso da doença pinta preta (*A. solani*) em tomateiro tanto em condições de casa-de-

vegetação como em campo. O trabalho verificou que os óleos de várias outras plantas medicinais testadas reduziram a doença pinta preta, porém o óleo de *C. citratus* foi o que levou aos mesmos resultados que o fungicida reduzindo em até 90% a severidade da doença. A produção de frutos comerciais foi 20% maior em relação à testemunha e semelhante ao fungicida testado. No entanto, o autor não verificou as causas da redução da doença, sendo os resultados aqui obtidos, relacionados a indução de resistência, um dos caminhos para elucidar tal proteção. Pois resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho são relatados com o indutor químico de resistência ASM e com novos produtos que estão sendo introduzidos no mercado. DANN e DEVERALL (2000) observaram ativação das enzimas β -1,3 glucanase e peroxidase em plantas de ervilha a *Uromyces viciae-fabae*, quando as plantas foram tratadas com altas dosagens de ASM.

Para LIU *et al.* (2005) a indução de resistência com ASM, resultou em aumento na atividade de polifenoloxidase em tratamento pós-colheita de frutos de pêssogo, promovendo redução da severidade de *Penicillium expansum* em 50%.

CAVALCANTI *et al.*, (2006) trabalhando com o patossistema tomate-*Xanthomonas vesicatoria*, verificaram que os ASM e Ecolife® conferiram proteção à doença. A resistência induzida nas plantas foi evidenciada principalmente pelo aumento significativo da atividade de peroxidase e polifenoloxidase, iniciado logo após as primeiras horas após as pulverizações estendendo até 12 dias.

RODRIGUES, A. *et al.* (2006) estudaram os efeitos de ASM, BABA e quitosana em cultivares de caupi contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* e observaram diferenças significativas entre os indutores e a testemunha, nas duas cultivares testadas, aos 5 e 10 dias após a inoculação, destacando o indutor ASM, que proporcionou um controle da doença em até 70%. O indutor ASM também apresentou melhores resultados nas atividades de β -1,3 glucanase, peroxidase e fenilalanina amonialiase (PAL), nos dois períodos analisados.

Não foi encontrado até o momento nenhum trabalho com OE de plantas medicinais na indução de mecanismos bioquímicos de resistência, porém utilizando extratos aquosos (EA) de plantas, vários pesquisadores vêm demonstrando os seus resultados, tanto na indução das enzimas aqui verificadas como outras relacionadas a patogênese. SCHNEIDER e ULLRICH (1994) trabalhando com extratos de *Reynoutria sachalinensis* em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) contra *Sphaerotheca fuliginea*, verificaram que o extrato de *R*

sachalinensis induziu as enzimas β -1,3-glucanase, quitinase, PAL, peroxidase e polifenoloxidase tanto em plantas de pepino como em plantas de fumo. ROTH *et al.* (2000) demonstraram que a aplicação de extrato aquoso de *Lychnis viscaria* resultou em proteção contra vírus e fungos em plantas de fumo, pepino e tomate. Em plantas de pepino foi verificado um aumento da atividade de até 20% da peroxidase, 30% de quitinase e 68% de β -1,3-glucanase, concluindo que o extrato da planta induz mecanismos bioquímicos de resistência. ASHA e KANNABIRAN (2001) verificaram que extratos de *Datura metel* conferiram proteção em sementes de pimenta contra *Colletotrichum capsici* por 35 dias e também verificaram aumento significativo nas atividades da peroxidase e polifenoloxidase em plantas de pimenta com o extrato a 10%.

KAGALE *et al.* (2005), também verificaram que o extrato de *D. metel* reduziu significativamente o desenvolvimento *in vitro* de *R. solani* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) e a incidência das doenças provocada pelos respectivos fitopatógenos em plantas de arroz (*Oryza sativa*) em condições de casa-de-vegetação. A indução de resistência no trabalho foi avaliada pelo incremento significativo da atividade de peroxidase, quitinase, β -1,3 glucanase e PAL. A atividade de peroxidase e β -1,3 glucanase tiveram aumento significativo entre 48 h a 96 h após a inoculação (hai) e a quitinase somente 164 hai. Já atividade de PAL teve incremento significativo 72 hai com *R. solani* e 164 hai com Xoo. Os pesquisadores concluíram que o extrato de *D. metel* possui atividade antimicrobiana *in vitro* e potencial para uso no controle de doenças tanto fúngicas como bacterianas como indutoras de resistência.

CHAKRABORTY *et al.* (2005) trabalhando com os extratos de *A. indica* e *Catharanthus roseus* no controle de *Curvularia pallescens* em plantas de chá, verificaram que o extrato de *A. indica* foi mais eficiente que o extrato de *C. roseus* na redução da severidade da doença. Entretanto, ambos os extratos foram eficientes na indução das enzimas β -1,3 glucanase, PAL e quitinase, associando a redução da doença com as enzimas induzidas.

Já RESENDE *et al.* (2007) estudando uma seleção de extratos vegetais, verificou que extrato aquoso e fervido de *S. lycocarpum* também conferiu redução da severidade da doença vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacauero (*Theobroma cacao*) e correlacionou com o aumento da atividade de peroxidase, quitinase e β -1,3 glucanase. A indução foi mais pronunciada no período de 4 a 18 dias após o tratamento quando comparadas com a testemunha.

Já RODRIGUES, E. *et al.* (2007), avaliando o extrato de gengibre (*Z. officinalis*) para o controle de *S. sclerotiorum* em alface, verificaram aumento da atividade da peroxidase nos tecidos das plantas e correlacionaram com o controle da doença.

Segundo PASCHOLATI e LEITE (1995) a proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento e subsequente inoculação da planta com o patógeno, indicando que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias são importantes neste fenômeno. No presente trabalho, o intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação foi de 72 horas e pode ter sido suficiente para que ocorresse a ativação dos mecanismos de indução. Resultados semelhantes foram verificados no mesmo patossistema tomate-*A. solani*, por YAMUNARANI *et al.* (2004) que verificaram que o extrato de *Quercus infectoria* a 0,5% possui eficiência no controle da doença pinta preta, quando aplicada preventivamente (72 h antes da inoculação). Já em relação à indução de resistência, foi relatado um incremento significativo das enzimas peroxidase, PAL, β -1,3 glucanase e quitinase. As enzimas peroxidase e PAL tiveram seu máximo aumento 48h após o tratamento, já o aumento das atividades de β -1,3 glucanase e quitinase ocorreram a partir de 72h após o tratamento. Os autores concluíram que o extrato obtido de *Q. infectoria* possui potencial como indutor de resistência para o patossistema tomate-*A. solani*.

Com os resultados observados no presente trabalho, pode-se verificar que o OE de *C. citratus* induz mecanismos bioquímicos de resistência, que podem afetar tanto direta como indiretamente o processo de infecção do patógeno, em tomate.

4.4 Mecanismos estruturais

A análise das epidermes dos discos foliares tratados com OE de *C. citratus*, 3 dias antes da inoculação, revelou a ocorrência de papilas e lignificação de células epidérmicas na concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ 48 horas após a inoculação com *A. solani* (Figura 5), não sendo observado fenômeno semelhante em discos foliares da testemunha.

A indução de mecanismos estruturais de resistência com o uso de óleos essenciais de planta medicinais não tem sido relatada, mas já existem trabalhos com o uso de extratos aquosos de cogumelos, extrato bruto aquoso e/ou alcoólico de plantas, ASM e microrganismos não patogênicos.

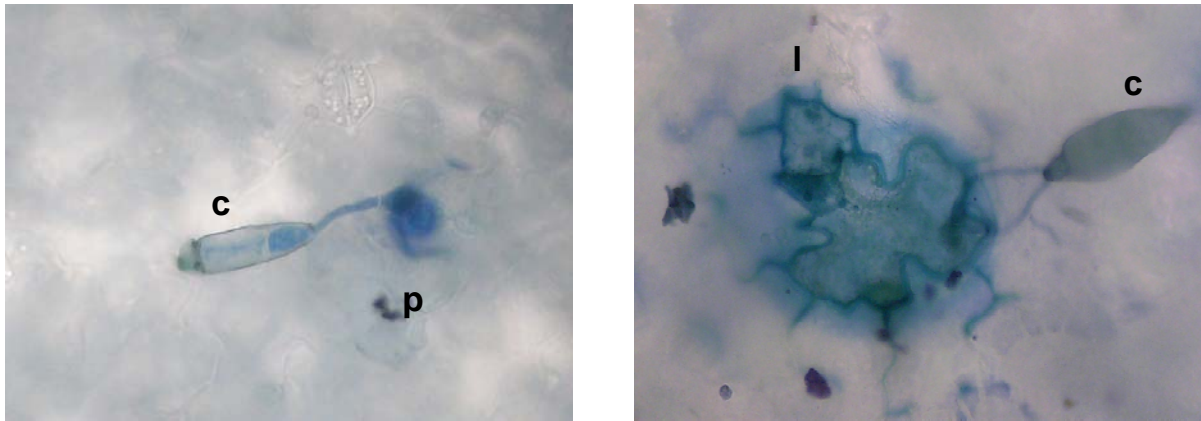


Figura 5. Ocorrência de papilas (A) e lignificações de células epidérmicas (B) em folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial *Cymbopogon citratus* e coletadas 48h após a inoculação *Alternaria solani*. c: conídio; p: papila; l: lignificação.

FIORI-TUTIDA (2003) tratou mesocótilos de trigo com EBAs dos cogumelos *Agaricus blazei* e *L. edodes*, 1 dia antes da inoculação com *Bipolaris sorokiniana*, e verificou que 24h após a inoculação já era possível visualizar a formação de papilas, afirmando que os EBA possivelmente ativaram alguma rota metabólica para a formação dessa estrutura nos pontos de penetração do patógeno.

BENHAMOU e BÉLNAGER (1998) revelaram que plantas de tomate suscetíveis a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* tratadas com o indutor químico ASM, reagiram mais rapidamente ao patógeno, através da formação papilas. A colonização do patógeno, restrita à epiderme e ao córtex externo das raízes, foi associado ao fortalecimento da parede celular pela rápida deposição de calose e de compostos fenólicos nas aposições de parede formadas nas plantas tratadas com ASM, fornecendo forte proteção contra a invasão vascular e contra toxinas e enzimas líticas produzidas por *Fusarium*.

STEIN *et al.* (1993) observaram indução de resistência em pepino a *C. lagenarium* por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, tanto em plantas-controle quanto em plantas inoculadas, em decorrência da deposição de grânulos contendo lignina e sílica em papilas.

OLVEIRA *et al.* (1997) inocularam hipocótilos de *Mimosa scabrella* com o não-patógeno *C. graminicola* e verificaram intensa formação de papilas nos sítios de infecção e a formação das referidas estruturas foi correlacionada com o aumento na atividade de peroxidases.

CADENA-GOMEZ e NICHOLSON (1987) estudaram a formação de papilas em plantas de milho e as correlacionaram aos níveis de peroxidase e suas isoenzimas, no início do processo de infecção por *Helminthosporium maydis* e *C. graminicola*, as quais coincidiram com o máximo de formação de apressórios dos fungos.

Com relação ao EBA de plantas o trabalho de COLPAS (2002) verificou que a aplicação do EBA de *O. gratissimum*, na concentração de 10%, 3 dias antes da inoculação com *C. lagenarium*, levou a formação de papilas nas epidermes de hipocótilos de pepino coletadas 36h após a inoculação. Níveis de quitinase também foram evidenciados com tratamento com EBA, porém não foram suficientes em conter o desenvolvimento da doença.

No presente trabalho, é possível correlacionar a formação de papilas com a indução da enzima peroxidase, pois foi observado um aumento significativo dessa enzima no tempo de coleta 48h após a inoculação, coincidindo com a formação de mecanismos estruturais (papilas e lignificação) nos discos foliares analisados. As peroxidases participam do processo de lignificação de células vegetais, sendo requeridas para a polimerização final de compostos fenólicos junto à lignina. A lignificação, dessa forma pode afetar o desenvolvimento fúngico por bloquear fisicamente o crescimento, reduzir a difusão de nutrientes para o fungo ou levar à síntese de precursores de lignina tóxicos ao fungo.

É possível que estas alterações bioquímicas e estruturais da parede celular vegetal após a infecção, contribuíssem para a resistência de alguma forma, seja por bloquear diretamente a penetração ou por atrasar o processo de penetração, sendo suficientes para conferir-lhe resistência contra *A. solani* de modo a conter o desenvolvimento da doença, como observado no trabalho realizado por ABREU (2006).

Assim, neste trabalho verificou-se que o OE de *C. citratus* possui potencial como elicitador de indução de resistência em plantas de tomateiro, sendo que a sua utilização poderia ser uma opção de controle em cultivos orgânicos ou em cultivos convencionais em sistema de manejo integrado reduzindo assim a aplicação de fungicidas comerciais.

5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O óleo essencial (OE) *Cymbopogon citratus* não causou nenhum tipo de fitotoxidez em plantas de tomateiro;
- O OE mostrou-se fungitóxico a *Alternaria solani* em condições *in vitro*, mas não *in vivo*;
- O OE foi capaz de induzir mecanismos bioquímicos de resistência, caracterizado pelas enzimas peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3-glucanase e mecanismos estruturais, como papilas e lignificação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B., FOENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β -1,3 glucanase in *Phaseolis vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 45, p. 395-400, 1970.
- ABREU, C.L.M., **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. Botucatu, 2006. 71p. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- ACEDO, A.L.J.R. Postharvest biocontrol of bacterial soft rot in cabbage using botanicals. **Philippine Journal of Crop Science**, Laguna, v. 24, p. 12, 1999. suplemento.
- ADEGOKE, G.O.; ODESOLA, B.A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **International Biodeterioration**, Edinburgh, v. 37, n. 1-2, p. 81-84, 1996.
- AGRIOS, G. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004.
- ARAÚJO, J.C.A; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação entre *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 268-275, 2004.
- ASHA, A.N., KANNABIRAN, B. Effect of Datura metel leaf extract on the enzymatic and nucleic acid changes in the chilli seedlings infected with Colletotrichum capsici. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.54, p. 373-375, 2001.
- BALBI-PEÑA. *et al.* Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. avaliação *in vitro* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, 2006a.
- BALBI-PEÑA. *et al.* 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, 2006b.
- BALDO, M. *et al.* Potencial do extrato bruto de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Cymbopogon nardus* (citronela) no controle *in vitro* de *Cladosporium fulvum* do tomateiro. In: JORNADA CIENTÍFICA DA UNIOESTE, 3., 2005, Marechal Cândido Rondon. **Anais...** Marechal Cândido Rondon: PRPPG, 2005. p. 12.
- BAPTISTA, M.J., RESENDE, F.V., OLIVEIRA, A.R. Avaliação de produtos alternativos no manejo da pinta preta do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasília, v. 2, n. 2, 2007.
- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p.441-443, 1997.
- BENHAMOU, N.; BELANGER, R. Benzothiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, n. 4, p. 1203-1212, 1998.

- BERTINI, L.M. *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, 2005.
- BESSER, K. *et al.* Analysis of gene induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, p. 277-286, 2000.
- BETTIOL, W.; STADNIK, M.J. Controle alternativo. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.). **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 165-192.
- BIANCHI, A. *et al.* F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 1241-1246, 1997.
- BINDER, A. *et al.* Mechanisms in systemic induced disease resistance. In: LUGTENBERG, B.J.J. (Ed.). **Signal molecules in plants and plant-microbe interactions**. Berlin, 1989, p. 267-272.
- BOLWELL, G.P. *et al.* The origin of the oxidative burst in plants. **Free Radical Research**, London, v. 23, p. 517-532, 1995.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.
- 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**, Amsterdam, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor-induced and wound-induce oxidative cross-linking of a praline-rich plant cell wall protein – a novel, rapid defense response. **Cell**, Orlando, v. 70, n. 1, p. 21-30, 1992.
- CACHINERO, J.M. *et al.* Plant defence reaction against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris and nonhost isolates of *F. oxysporum*. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 765-776, 2002.
- CAMPOS, A.D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.
- CANDENA-GOMEZ, G.; NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: a non-specific response of attempted fungal penetration of maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 31, p. 51-67, 1987.
- CASTRO, H.G. *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde de Rio Branco:[s.n.], 2004. 113p.
- CAVALCANTI, F.R. *et al.* Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na Indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31. n. 41, 2006.
- CAVALCANTI, F.R. *et al.* Atividade de quitinase e beta-1,3 glucanase após elicitação das defesas do tomateiro contra mancha-bacteriana. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.

CAVALCANTI, L.S. BRUNELLI, K.R., STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 81-124.

CAVALCANTI, S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM)**. Lavras, 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CHAERANI, R.; VOORRIPS, RE. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics and breeding for resistance. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 72, p. 335-347, 2006.

CHAKRABORTY, B.N. *et al.* Induction of resistance in tea plants against *Curvularia pallaseiens* by foliar application of leaf extracts. **Journal of Hill Research**, Índia, v. 18, n.2, p. 69-78, 2005.

CIPOLLINI, D.F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, Berlin, v. 131, p. 514-520, 2002.

COLPAS, F.T. **Atividade eliciadora de extratos de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.)**. Maringá, 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Maringá.

CONSTABEL, C.P.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

CONTI, G.G. *et al.* A.M. Host-parasite relationship in a susceptible and a resistant rose cultivar inoculated with *Sphaerotheca pannosa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 117, p. 312-320, 1986.

CORREA JÚNIOR, C., MING, L.G., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v. 1, 1031 p.

COSTA, L.C.B. *et al.* Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 956-959, 2005.

CUTT, J.R.; KLESSIG, D.F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS JR, F. **Plant gene research: Genes involved in plant defense**. Wien: Springer-Verlag, 1992. p. 209-243.

DANN, E.; DIERS, B.; BYRUM, J.; HAMMERSCHMIDT, R. Effect of treating soybean with 2,6-dicloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 271-278, 1998.

DANN, E.K. *et al.* The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and -1,3 glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 307-319, 1996.

DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, London, v. 49. p. 324-322, 2000.

DEVI, S.B.; NASEEMA, A.; NAIR, M.C. In vitro effect of lemongrass oil on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, n. 4, v. 35, p. 741-746, 1982.

DHINGRA, O.D. *et al.* Essential Oil of Mustard to Control *Rhizoctonia solani* Causing Seedling Damping off and Seedling Blight in Nursery. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6. p. 683-686, 2004.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial purification of elicitors *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 175-180, 2006.

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudos Multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996. p. 109-127.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 351-359, 1999.

ECKSTEIN, B., **Histopatologia da interação entre *Alternaria solani* e plantas de tomateiro tratadas com extrato de cúrcuma (*Curcuma longa*) e curcumina**. Marechal Candido Rondon, 2005. 30 p. Monografia (Graduação em Agronomia)-Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

EL FATTAH M. *et al.* Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal of Agricultural Research**, River Nile, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

EMBRAPA Hortaliças. Cultivo de tomate para industrialização. Importância econômica. Disponível em <<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/index.htm>>. Acesso em: 06 set. 2007.

FILGUEIRA, F.A.R. Solanáceas II. Tomate: a hortaliça cosmopolitana. In: FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 193-225, 2003.

FIORI, A.C.G. *et al.* Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extratos de cogumelos comestíveis e medicinais no controle da ferrugem da folha e Helminthosporiose em trigo**. Maringá, 2003. 119p. Tese (Doutorado)–Universidade Estadual de Maringá.

- FLURKEY, W.H. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 481-483, 1989.
- FRANZENER, G. *et al.* 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. 2003.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 37, p. 165-186, 1986.
- GRAHAM, T.L., GRAHAM, M.Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 1123-1133, 1996.
- GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3 glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, p. 449-454, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p. 177-199.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 77-84, 1999.
- HAMMERSCHMIDT, T; NUCKLES, E.M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.
- HANADA, R.E.; ROMEIRO, R.S. Seleção preliminar de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutores de resistência sistêmica a *Xantomonas campestris* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 209, 1998.
- HIJWEGNWN, T.; VERHARR, M.A.; ZADOKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, London. v. 45, p. 632-635, 1996.
- HIRAGA, S. *et al.* A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.
- HOAGLAND, R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: Hoagland, R.E. (ed.) **Microbes and microbial products as herbicides**, Washington: American Chemical Society, p.87-113, 1990.
- INTRAPUK, C.I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.285-286, 1994.
- IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003a.
- IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 85, n. 4, p. 265-270, 2003b. special issue

ISHIGE, F. *et al.* H. Identification of a vasic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as c cationic peroxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.193-199, 1993.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compedium of tomato diseases**. Saintt Paul: APS, 1993. 73p.

JUNG, W.J. *et al.* T.H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 645-652, 2004.

KAGALE, S. *et al.* Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Dactura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, p. 91-100, 2004.

KAWANO, T.; MUTO, S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 685-693, 2000.

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

KESSMAN, H.T. *et al.* Inductions of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Stanford, v. 32, p. 439-459, 1994.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 761-785

KOIKE, N. *et al.* Induction of systemic resistance in cumcuber against several disease by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 523-533, 2001.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KÚC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 7-12. 2001.

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

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Editora Ceres, v. 2, p. 607-626, 2005.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*).** Piracicaba, 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”–USP.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, p. 273-279, 1972.

LIU, H. *et al.* Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, p. 263-269, 2005.

LOPES, C.A.; REIS, A.; ÁVILA, AC. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v. 24, n. 219, p. 66-78, 2003.

LOPES, C.A. *et al.* Doenças: identificação e controle. In: SILVA, JB.; GIORDANO, LB. (Org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa Hortaliças, p. 88-111. 2000.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 163-175, 1998.

MAFFIA, L. A. MARTINS, M. C.; MATSUOKA, K. Doenças do tomateiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, p. 42-60, 1980.

MARTINEZ, S.S. **O Nim: *Azadirachta indica*** – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142p.

MAUCH, F; STAEHELIN, L.A. Functional implications of the subcelular localization ethylene-induced chitinase and of 1,3 glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 447-457, 1989.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.

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

MING, L.C. *et al.* Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) Poaceae. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 426, p. 555-559, 1996.

MISHRA, A.K.; DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1101–1105, 1994.

- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, p. 491-498, 2002.
- MONTES-BELMONT, R.; GARCIA-LICONA, R. Efecto de extractos vegetales en la germinación de esporas y en los niveles de dano de *Alternaria solani* en tomate. **Fitopatologia**, Lima, v. 32, p. 52-57, 1997.
- MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992.
- MOREIRA, F. **Plantas que curam**. 5. ed. São Paulo: Hemus Editora Limitada, 1996. 255p.
- MURPHY J.F. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in Tomato against tomato mottle vírus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 779-784, 2000.
- NGUEFACK, J. *et al.* Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 94; n. 3, p. 329-334, 2004.
- O'BRIAN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 59, p. 367-373, 1964.
- OHNO, T. *et al.* Antimicrobial Activity of Essential oil against Helicobacter pylori. **Heliobacter**, Houston, v. 8, p. 207-215, 2003.
- OKOT-KOTBER, M. *et al.* Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 2410-2417, 2002.
- OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotylis inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 22, n. 2, p. 195-197, 1997.
- PARANAGAMA, P.A. *et al.* Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice lemon grass. **Letters in Applied Microbiology**, New York, v. 37, p. 86-90, 2003.
- PASCHOLATI, S.F. **Potencial de Saccharomyces cerevisiae e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123 p. Tese (Livre Docência)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In. BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H., AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-454.

PENG, X. *et al.* Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. *Phytoparasitica*, **Bet Dagan**, Israel, v. 32, p. 377-387, 2004.

PEREIRA, M.C. *et al.* Inibição do desenvolvimento fúngico através de utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PIGNONI, E.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Severidade da antracnose em feijoeiro e pinta preta em tomateiro sob diferentes concentrações de óleo de nim em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 68-72, 2005.

PRITHIVIRAJ, B. *et al.* Antifungal activity of bergenin, a constituent of *Flueggea microcarpa*. **Plant Pathology**, London, v. 46, n. 2, p. 224-228, 1997.

QUEIROZ, F. **Estudo da cinética de extração do óleo essencial de capim-limão com dióxido de carbono líquido**. Campinas, 1993. 156p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)—Universidade Estadual de Campinas-UEC.

RAJA, J.; KURUCHEVE, V. Influence of plants extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 51, p. 102-103, 1998.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 429-441, 2002.

REIMMANN, C.R.; RINGLI, C.; DUDLER, R. Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1611-1612, 1992.

RESENDE, M.L.V. *et al.* Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, London, v. 5, p. 621-628, 2002.

RESENDE, M.R. *et al.* Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra Vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 213-221, 2007.

RODRIGUES, A.A.; NETO, E., COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, E. *et al.* Atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.

RODRIGUES, E. *et al.* Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, 2006.

ROMEIRO, R.S.; KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 495-498, 1997.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria***: biology, epidemiology and pathogenicity. Saint Paul: APS Press, 1994.

ROTH, U., FRIEBE, A., SCHNABL, H. Resistance induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lychnis viscaria* L. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 55, n. 7, p. 365-367, 2000.

ROZWALKA, L.C. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. Curitiba, 2003. 45p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná.

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

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

SCHUCK, V.J.A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 125-138.

SILVA, D.M.H, BASTOS, C.N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, H.S.A. *et al.* Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA, I. *et al.* **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste, 1995. 203p.

SINGH, R.; RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios**, v. 102, n. 403, p. 165-173, 2000.

SINGH, U.P. *et al.* Fungitoxic activity of some essential oils. **Economic Botany**, New York, v. 3-4, p. 186-190, 1980.

SINGH, U.P. *et al.* G.D. Control of powdery mildew of pea by ginger extract. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 44, p. 55-59, 1991.

SOBRINHO, C.A., FERREIRA, P.T., CAVALVANTI, L.S. Indutores abióticos In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. p. 51-80.

SORNBERGER, A. **Potencial do extrato bruto de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*, no controle *in vitro* de *Alternaria solani* do tomateiro**. Marechal Cândido Rondon, 2005. 25 p. Monografia (Graduação em Agronomia)-Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 95-116.

STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, 2004. 293p.

STANGARLIN, J.R. *et al.* Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 16-21, 1999.

STEIN, B.D.; KLOMPARENNS, K.; HAMMERSCHMIDT, R. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants of *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 137, p. 177-188, 1993.

THIYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 105-117, 2004.

VALARINI, P.J. FRIGHETTO, R.T.S.; SPADATTO, C.A., Potencial de uso da erva medicinal *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigadas. **Científica**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 199-214, 1996.

VALARINI, P.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. Potencial da erva medicinal *Cymbopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 69, p. 139-150, 1994.

VALE, F.X.R. *et al.* Doença causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIN, L.; VALE, FXR.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. Viçosa: os editores, 2000. p. 699-756.

VAN DAM, N.M.; BALDWIN, I.T. Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. **Functional Ecology**, Oxford, v.15, p.406-415, 2001.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plant and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 753-765, 1997.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Stanford, v. 18, p. 259-288, 1980.

VIGO-SCHULTZ, S.C. *et al.* Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, 2006.

WHITAKER, J.R. Polyphenol oxidase. In: FENNEMA, O.R. (Ed.) **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York: Marcel Dekker. Inc. 1994. p. 543-556.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemistry Journal**, London, v. 322, p. 681-692, 1997.

YAMUNARANI, K. *et al.* Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v. 26, n. 3, p. 281-290, 2004.

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

ZAVAREH, A.H.J., TEHRANI, A.S. The effect of several compounds on the induction of resistance to powdery mildew in cucumber. **Iranian Journal of Plant Pathology**, Tehran, v. 41, n. 4, p. 207-213, 2005.

7 APÉNDICE

Quadro 1A. Probabilidade mínima para ser significativa das variáveis analisadas através dos testes de Levene para homogeneidade da variância, e teste de Shapiro-Wilk para normalidade dos erros

Variável	Teste de Levene	Teste de Shapiro-Wilk
Atividade de peroxidase (local)	0,0121	0,0158
Atividade de peroxidase (sistêmico)	0,1368	0,3643
Atividade de polifenoxidase (local)	0,1572	0,1263
Atividade de polifenoxidase (sistêmico)	0,4650	0,0183
Atividade de β -1,3 glucanase (local)	0,0145	0,0165

Os dados apresentam variância homogênea e erros com distribuição normal quando $p > 0,01$.