

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

CAMILA HENDGES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CONTROLE DA PINTA PRETA E ATIVAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA EM TOMATEIRO POR ÓLEOS ESSENCIAIS**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

CAMILA HENDGES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CONTROLE DA PINTA PRETA E ATIVAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA EM TOMATEIRO POR ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Márcia de Holanda Nozaki

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Hendges, Camila

Atividade antifúngica, controle da pinta preta e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro por óleos essenciais / Camila Hendges; orientador(a), José Renato Stangarlin; coorientador(a), Márcia de Holanda Nozaki, 2019.

79 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

1. *Alternaria solani*. 2. Controle alternativo. 3. Indução de resistência. I. Stangarlin, José Renato. II. Nozaki, Márcia de Holanda. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

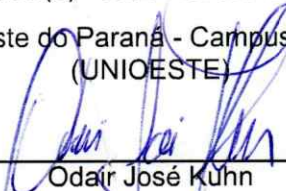
CAMILA HENDGES

Atividade antifúngica, controle da pinta preta e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro por óleos essenciais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)


Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon
(UNIOESTE)


Gilmar Franzener

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Marechal Cândido Rondon, 27 de fevereiro de 2019

*A Deus e
Aos meus pais João Hendges e Semilda Nies Hendges*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção e por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, João Hendges e Semilda Nies Hendges, meu noivo Donizete Batista Carmelo, minha irmã Caroline Hendges, meu cunhado Bruno Fernandes, que não mediram esforços para me auxiliar na condução dos experimentos, pelo apoio e compreensão nesta caminhada.

Um agradecimento em especial ao meu orientador professor Dr. José Renato Stangarlin, pela excelente orientação, ensinamentos, paciência e profissionalismo.

À minha coorientadora professora Dr^a. Márcia de Holanda Nozaki, pelos ensinamentos, incentivo e por acreditar na minha capacidade.

A todos os mestres do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por transmitirem seus conhecimentos durante estes anos.

À minha amiga Jéssica Manfrin, pela amizade e por disponibilizar material vegetal para realização dos experimentos.

À minha amiga Eloisa Lorenzetti, pela dedicação e disponibilidade para me auxiliar e ensinar as técnicas de análises.

Aos amigos da Pós-Graduação Andréia da Paz Schiller, Cleonice Lubian, Daniele Cristina Schons, Giovana Ritter, Leila Alves Netto, Tatiane Eberling, Tauane Santos Brito, Jaqueline de Araújo Barbosa, Alfredo José Alves Neto e Cristiane Belmonte pela amizade e companheirismo.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, *campus* Toledo, por ter disponibilizado os laboratórios e toda sua estrutura para condução dos experimentos.

A todos os funcionários da Pontifícia Universidade Católica do Paraná *campus* Toledo e da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Marechal Cândido Rondon, que auxiliaram direta ou indiretamente na condução deste trabalho.

Aos companheiros do grupo COBALFI.

À empresa Herbioeste Herbicidas Ltda., no qual trabalhei durante o mestrado, pela flexibilidade nos horários de trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

HENDGES, Camila, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro – 2019. **Atividade antifúngica, controle da pinta preta e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro por óleos essenciais.** Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Coorientador: Prof^a. Dr^a. Márcia de Holanda Nozaki

A pinta preta, cujo agente causal é o fungo *Alternaria solani*, é uma das doenças que mais atinge o tomateiro, sendo que o prejuízo afeta diretamente a produtividade. Uma forma de controle dessa e de outras doenças é o uso de óleos essenciais, podendo substituir a utilização de fungicidas, não causando danos ao meio ambiente e ao homem. Diante do exposto, este trabalho foi realizado objetivando avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a ativação de enzimas de defesa em tomateiro tratado com os óleos essenciais de bergamota (*Citrus aurantium*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*). Os experimentos com cada óleo foram conduzidos separadamente. Discos miceliais do patógeno *A. solani* foram depositados em placas de Petri que continham os tratamentos: 0, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial e fungicida (azoxistrobina + difenoconazol). As placas foram armazenadas em BOD a 25 °C e escuro, sendo avaliados os parâmetros de crescimento micelial e esporulação. Sementes de tomate foram semeadas em bandeja de poliestireno expandido e após 30 dias foram transplantadas para cultivo no chão em casa de vegetação. Após 15 dias foram aplicados os tratamentos, nas concentrações citadas anteriormente, na segunda folha na parte inferior da planta, sendo que após 72 horas foi inoculado o patógeno nas folhas tratadas (segundo par de folhas) e nas não tratadas (terceiro par de folhas). A severidade da doença foi expressa por meio da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Também foram avaliadas as enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase envolvidas no processo de defesa. Nesse ensaio para análise enzimática foram utilizadas as concentrações de óleo de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ para bergamota, 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ para citronela e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ para melaleuca. O aumento das concentrações de todos os óleos essenciais inibiu o crescimento micelial do patógeno. A esporulação do patógeno apresentou decréscimo com o aumento das concentrações dos óleos essenciais de bergamota e citronela, porém, para o óleo de melaleuca, a esporulação foi favorecida com o acréscimo das concentrações. A concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ resultou na menor

AACPD, tanto nas folhas tratadas (21,59%) quanto nas não tratadas (53,69%) para o óleo essencial de bergamota. Já para o óleo de citronela, a AACPD foi reduzida em 38,14% nas folhas tratadas com a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ e em 51,32% nas não tratadas. Nas folhas tratadas com óleo essencial de melaleuca, a concentração 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou a maior redução da AACPD, correspondente a 53,32%, sendo que nas folhas não tratadas a concentração mais eficaz foi 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ com inibição de 42,30%. Incremento na atividade de peroxidase e fenilalanina amônia-liase foi observada com os óleos essenciais de bergamota, citronela e melaleuca. A atividade de polifenoloxidase, por sua vez, apresentou incremento com os óleos de bergamota e citronela. Os óleos essenciais de bergamota, citronela e melaleuca podem ser uma alternativa no controle da pinta preta do tomateiro.

Palavras-chave: *Alternaria solani*. *Citrus aurantium*. *Cymbopogon nardus*. *Melaleuca alternifolia*. Controle alternativo. Indução de resistência.

ABSTRACT

HENDGES, Camila, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February – 2019. **Antifungal activity, control of early blight and activation of plant defense mechanisms in tomato by essential oils.** Advisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Co-advisor: Prof^a. Dr^a. Márcia de Holanda Nozaki.

The early blight, caused by the fungus *Alternaria solani*, is one of the diseases that most affects the tomato crops, whose damage directly affects the productivity. A source of inhibition of this and other diseases is the use of essential oils, which may replace the use of fungicides, causing no harm to the environment or human. This work was carried out with the aim of evaluating the antifungal activity, the control of the early blight and activation of defense enzymes in tomato treated with the essential oils of bergamot orange (*Citrus aurantium*), citronella (*Cymbopogon nardus*) and tea tree (*Melaleuca alternifolia*). Experiments with each oil were conducted separately. Mycelial disks of the *A. solani* pathogen were deposited on Petri dishes containing the treatments: 0, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ of essential oil and fungicide (azoxystrobin + diphenconazole), maintained in BOD at 25 °C and dark, and the parameters of mycelial growth and sporulation were evaluated. Tomato seeds were sown in an expanded polystyrene tray and after 30 days were transplanted to the ground under greenhouse conditions. After 15 days the treatments mentioned above were applied to the second pair of leaves in the lower part of the plant, and after 72 hours the pathogen was inoculated in the treated leaves (second pair of leaves) and untreated (third leaves). The severity of the disease was expressed through the area under the disease progress curve (AUDPC). The enzymes involved in the defense process were also evaluated, such as peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase, using the oil concentrations of 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ for bergamot, 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ for citronella and 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ to tea tree. The increase of the concentrations of all the essential oils decreased the mycelial growth of the pathogen. The sporulation of the pathogen decreased with the increase of the essential oil concentrations of bergamot and citronella, but to the oil of tea tree, the sporulation was favored with the addition of the concentrations. The concentration of 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ resulted in the lowest AUDPC, both in treated (21.59%) and untreated (53.69%) leaves for bergamot essential oil. For citronella oil, AUDPC

was reduced by 38.14% in treated leaves and 51.32% in those not treated with the concentrations of 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. In the leaves treated with essential oil of tea tree, the concentration 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ presented the largest reduction of AUDPC, corresponding to 53.32%, and in the untreated leaves the most effective concentration was 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ with inhibition of 42.30%. Increase in the activity of peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase was observed with the essential oils of bergamot, citronella and tea tree. The polyphenoloxidase activity, on the other hand, presented increase just with the oils of bergamot and citronella. The essential oils of bergamot, citronella and tea tree can be an alternative in the control of the early blight of tomato.

Keywords: *Alternaria solani*. *Citrus aurantium*. *Cymbopogon nardus*. *Melaleuca alternifolia*. Alternative control. Resistance induction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	ARTIGO I - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA	4
2.1	INTRODUÇÃO.....	5
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
2.4	CONCLUSÕES.....	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
3	ARTIGO II - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA.....	25
3.1	INTRODUÇÃO.....	26
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.4	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4	ARTIGO III - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA	46
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.4	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma cultura de grande valor comercial no Brasil. A olerícola é amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais no mundo inteiro. Além do seu valor econômico, alimentar e medicinal, o cultivo do tomateiro também tem grande importância social, na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda grande quantidade de mão-de-obra, desde o seu cultivo até sua comercialização final (CARVALHO et al., 2014).

O tomateiro é uma das espécies cultivadas mais sujeitas à ocorrência de doenças. As doenças fúngicas são aquelas mais comumente encontradas, sendo a atividade agrícola que mais utiliza fungicida (FILGUEIRA, 2003). A pinta-preta do tomateiro (*Alternaria solani*) é uma das doenças foliares mais frequentes, ocorrendo em praticamente todas as regiões onde se cultiva o tomateiro (FILGUEIRA, 2008).

Estudos têm comprovado que os métodos clássicos de controle de patógenos acabam sendo prejudiciais, uma vez que os fungicidas sintéticos são mais persistentes no ambiente e menos seletivos, provocando alterações na biodiversidade do local. Dessa forma, essa problemática vem reforçando a necessidade de pesquisas em busca de métodos alternativos para o controle de fitopatógenos (CAMARGO, 2007).

As substâncias naturais obtidas de extratos vegetais e óleos essenciais, além de terem como vantagem o fato de não oferecerem riscos à saúde humana e não promoverem a contaminação ambiental, são promissoras no controle de doenças em várias culturas e uma alternativa ao uso de agrotóxicos (LUCAS, 2012).

A indução de resistência por produtos naturais surge nesse cenário como uma alternativa ao uso de agrotóxicos, uma vez que agentes bióticos e abióticos podem ativar mecanismos de defesa das plantas, evitando os danos causados pelo controle químico (IURKIV, 2009). A indução pode ser manifestada apenas nos tecidos que tiveram contato com o agente indutor, ocorrendo uma proteção local, como também uma indução de resistência sistêmica, quando a manifestação da indução ocorre em local diferente daquele onde houve a aplicação do tratamento (MORAES, 1992).

Quando expostas a ataques de patógenos, as plantas utilizam mecanismos de defesa que agem como barreiras físicas, que impedem a penetração do patógeno na planta e também ativam reações bioquímicas, por meio de substâncias que

protegem as células e tecidos, criando condições desfavoráveis para o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005).

Essas reações bioquímicas ocorrem por meio de mecanismos de defesa que podem ser pré-formados ou pós-formados, sendo que estes últimos possuem papel fundamental na indução de resistência. Os mecanismos pré-formados já estão presentes nas plantas antes do contato com o patógeno. Os pós-formados, por sua vez, estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção do patógeno e são ativados quando a planta reconhece os sinais emitidos por um patógeno ou agente indutor, quando em contato com a planta (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

As alterações na atividade enzimática nos metabolismos primário e secundário podem ser decorrentes de alterações metabólicas provocadas pelos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos, envolvendo enzimas como a peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (STANGARLIN et al., 2011a).

As peroxidases são enzimas responsáveis por participarem de vários processos fisiológicos em tecidos de plantas, destacando-se a lignificação, que pode interferir com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

As polifenoloxidases (PFO) são amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, bactérias, fungos e algas, sendo geralmente encontradas em abundância em tecidos atacados por insetos ou patógenos. Esta enzima atua na resistência a doenças por meio da sua capacidade de oxidar compostos fenólicos em quinonas (AGRIOS, 2005).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é responsável pela desaminação da L-fenilalanina e atua na rota dos fenilpropanóides (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Conforme Camm e Towers (1973), esta enzima é sensível ao estado fisiológico das plantas, podendo variar em pouco tempo, devido a sua elevada variedade de estímulos.

Diversos trabalhos têm mostrado o potencial de óleos essenciais e extratos de plantas medicinais para o controle de fitopatógenos, tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela indução de resistência em plantas tratadas com os mesmos (STANGARLIN et al., 2011b).

Os óleos essenciais de eucalipto e citronela inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, causador de antracnose em frutos de mamão,

conforme Machado et al. (2013), confirmando a eficácia de produtos derivados de plantas medicinais no controle de fungos.

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* são promissores na atividade antifúngica, uma vez que, Pires e Piccoli (2012) avaliaram o efeito inibitório destes óleos no crescimento micelial de *Penicillium expansum* e concluíram que a concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ causou inibição total do crescimento micelial do patógeno.

Avaliando o efeito do óleo essencial de melaleuca sobre fungos fitopatogênicos, Martins et al. (2010) concluíram que o desenvolvimento de *Alternaria alternata* pode ser inibido com a utilização desse óleo.

Lucas (2012) verificou o controle da pinta preta em tomateiro pelos óleos essenciais de canela, citronela, capim-limão, cravo-da-índia, tomilho, eucalipto e árvore-de-chá. Todos os óleos essenciais, em alguma concentração, apresentaram algum nível de inibição da doença, comprovando que as plantas medicinais possuem capacidade de indução de resistência.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica e o controle da *Alternaria solani* em tomateiro tratado com óleos essenciais de bergamota, citronela e melaleuca, além de verificar a ativação das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

2 ARTIGO I - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE BERGAMOTA

RESUMO: A pinta preta do tomateiro causa prejuízos significativos na cultura, afetando diretamente a produtividade. Uma alternativa ao uso frequente de agrotóxico é a utilização de óleos essenciais, que podem atuar na defesa contra fitopatógenos. Diante do exposto, este trabalho foi realizado objetivando avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a atividade de enzimas de defesa no tomateiro tratado com óleo essencial de bergamota (*Citrus aurantium*). Discos miceliais de *Alternaria solani* foram adicionados em placas de Petri contendo os tratamentos 0, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além de um tratamento padrão com fungicida (azoxistrobina + difenoconazol), e mantidas em BOD a 25 °C e escuro, sendo avaliados o crescimento micelial e a esporulação. Plantas de tomate foram cultivadas em casa de vegetação e foram aplicados os tratamentos citados no segundo par de folhas e após 72 horas foi inoculado o patógeno nas folhas tratadas (segundo par de folhas) e nas não tratadas (terceiro par de folhas). A avaliação de severidade foi expressa através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase foi avaliada na concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. O aumento das concentrações do óleo essencial diminuiu o crescimento micelial e a esporulação do patógeno, tendo decréscimo de 68,15% e 29,48%, respectivamente. A concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ resultou na menor AACPD, sendo semelhante ao fungicida, tanto nas folhas tratadas quanto nas não tratadas. Foi constatada a indução da atividade de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase de maneira local e sistêmica. O óleo essencial de bergamota pode ser uma alternativa no controle da pinta preta do tomateiro.

Palavras-chave: Controle alternativo. Indução de resistência. *Citrus aurantium*. *Alternaria solani*.

ARTICLE I - ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CONTROL OF EARLY BLIGHT ON TOMATO BY ESSENTIAL OIL OF BERGAMOT ORANGE

ABSTRACT: The early blight of tomato causes significant losses in the crop, directly affecting productivity. An alternative to the frequent use of pesticides is the use of essential oils, which may act in defense against phytopathogens. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity, the control of the early blight and the activity of defense enzymes of tomato treated with bergamot orange (*Citrus aurantium*) essential oil. Mycelial disks of the *Alternaria solani* were added in Petri dishes, containing the treatments 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ of essential oil, besides a treatment with fungicide (azoxystrobin + diphenconazole), maintained in BOD at 25 °C and dark, where the mycelial growth and sporulation were evaluated. Tomato plants were cultivated under greenhouse conditions and the treatments were applied in the second pair of leaves and after 72 hours the pathogen was inoculated on the treated (second pair) and untreated leaves (third pair). The severity assessment was expressed through the area under the disease progress curve (AUDPC). The enzymatic activity of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase was evaluated at a concentration of 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. The increase of the concentrations of the essential oil reduced the mycelial growth and sporulation of the pathogen, decreasing of 68.15% and 29.48%, respectively. The concentration of 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ resulted in the lowest AUDPC, which was similar to the fungicide, in both treated and untreated leaves. The enzymatic activity of polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase was observed local and systematically. The essential oil of bergamot can be an alternative in the control of the early blight of tomato.

Key words: Alternative control. Resistance induction. *Citrus aurantium*. *Alternaria solani*.

2.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) possui valor econômico e alimentar, e também grande importância social, na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda grande quantidade de mão-de-obra, desde o seu cultivo até sua comercialização final (INCAPER, 2010).

O tomateiro é uma das espécies cultivadas mais sujeitas à ocorrência de doenças, as quais são responsáveis por significativas perdas na produção. A pinta

preta, também conhecida por mancha de alternaria, cujo agente causal é o fungo *Alternaria solani*, é uma das doenças foliares mais frequentes, ocorrendo em todas as regiões onde se cultiva a hortaliça (FILGUEIRA, 2008). Este patógeno apresenta elevado poder destrutivo em condições de temperaturas entre 25 e 30 °C e umidade relativa elevada (INOUE-NAGATA et al., 2016; VALE et al., 2000).

A utilização de cultivares resistentes não é possível, pois no Brasil ainda não estão disponíveis para comércio, o que torna a utilização de produtos químicos um dos principais métodos de controle (INOUE-NAGATA et al., 2016). As decisões dos produtores para adoção dessas técnicas visam, principalmente, minimizar o risco de prejuízos financeiros, uma vez que o custo de implantação e de condução da lavoura é muito grande (VALE et al., 2004).

As substâncias naturais obtidas de extratos vegetais e óleos essenciais são alternativas que visam reduzir e/ou amenizar o uso de produtos químicos, pois o uso intensivo desses pesticidas na agricultura acarreta em uma série de problemas ambientais como a contaminação dos alimentos, solo e água; intoxicação dos agricultores/aplicadores; seleção de fitopatógenos resistentes e eliminação de microrganismos benéficos do solo (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

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., 2011a).

A indução de resistência entra nesse cenário para amenizar o uso de agrotóxicos, por meio da ativação de mecanismos de defesa das plantas contra patógenos. Dentre os mecanismos das plantas, pode-se destacar a ativação de enzimas, como a peroxidase, polifenoloxidase e a fenilalanina amônia-liase (STANGARLIN et al., 2011b).

Os óleos essenciais possuem ampla composição química, podendo ser fontes de substâncias complexas e são considerados fontes de compostos biologicamente ativos, principalmente contra microrganismos (OLIVEIRA et al., 2011).

A bergamota pertence ao gênero *Citrus* e tem como principal destino o consumo *in natura* e a indústria de sucos, destinando-se também à extração do óleo

essencial contido em sua casca. Pesquisas têm sido realizadas para utilização desses óleos como agentes antimicrobianos potenciais (PIRES; PICCOLI, 2012).

Os óleos essenciais do gênero *Citrus* apresentaram eficiência em diversos patossistemas, como: *Botrytis cinerea* isolado de morango e óleo essencial de laranja e tangerina (LORENZETTI et al., 2011); *Alternaria solani* em frutos de tomate tratados com óleo essencial de bergamota (RANIERI et al., 2015); *Penicillium expansum* tratado com limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti (PIRES; PICCOLI, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a atividade das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em tomateiro tratado com óleo essencial de bergamota.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento indireto do patógeno *Alternaria solani* foi realizado a partir de fruto de tomate contaminado, cortando-se os fragmentos do tecido doente e depositando-os em placa de Petri contendo meio de cultura, sendo mantido a 25 °C e escuro em BOD. O isolado foi preservado pelo método de Castelani e tubo de ensaio com meio de cultura suco V8-ágar.

O óleo essencial de bergamota (*Citrus aurantium*) foi obtido em farmácia de manipulação, na cidade de Toledo (PR). O fungicida utilizado no experimento como tratamento padrão era composto pelo princípio ativo azoxistrobina + difenoconazol. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com sete tratamentos: 0; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além de tratamento com fungicida (azoxistrobina + difenoconazol, 40 mL 100 L^{-1} de água), com cinco repetições para cada tratamento.

A atividade antifúngica sobre o patógeno foi avaliada em teste de crescimento micelial e esporulação. Para tanto, o meio de cultura suco V8-ágar foi preparado e autoclavado (121 °C/15 min). Para os tratamentos, com o meio ainda fundente, foi adicionada a concentração de óleo essencial e detergente Tween 20 na proporção de 1:1 (v/v) para homogeneização das soluções. O fungicida também foi adicionado ao meio de cultura posteriormente à autoclavagem.

Após a solidificação do meio de cultura em cada placa de Petri (90 mm de diâmetro), foi depositado disco micelial de 6 mm da colônia com 14 dias de idade no

centro das placas. Em seguida, as mesmas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara tipo BOD a 25 °C e escuro.

O crescimento micelial foi avaliado por medições diárias do diâmetro das colônias (mm), em dois eixos perpendiculares entre si, iniciando 24 horas após a instalação do experimento até o momento em que um tratamento atingiu toda a superfície da placa de Petri. Para a relação entre os dias de avaliação e o crescimento micelial foram feitas medições até o momento em que todas as colônias cobriram toda a superfície do meio de cultura ou não apresentaram evolução do crescimento no decorrer dos dias.

Ao término da avaliação de crescimento micelial foi analisada a esporulação do fungo. Para isso, foram adicionados 10 mL de água deionizada em cada placa de Petri e após a raspagem da colônia com auxílio de uma lâmina de vidro, a suspensão foi filtrada em gaze, sendo determinado o número de esporos por mL em câmara de Neubauer. A esporulação foi calculada com base na área micelial de cada tratamento.

O experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação localizada em Toledo (PR). O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com os mesmos tratamentos citados anteriormente e quatro repetições.

A adubação do solo foi realizada conforme análise química do mesmo e necessidade da cultura. Sementes de tomate Caqui, cultivar Odete, foram semeadas em bandeja de poliestireno expandido de 200 células contendo substrato comercial. As mudas foram transplantadas aos 30 dias após a semeadura para cultivo em solo e suplementadas com fertirrigação.

Após 30 dias do transplântio, o segundo par de folhas, na parte inferior da planta, foi tratado com o fungicida e o óleo nas concentrações descritas anteriormente. Para obter mistura homogênea entre o óleo essencial e a água foi utilizado Tween 20 na proporção 1:1 (v/v).

Após 72 h da aplicação dos tratamentos, o 2º par de folhas tratadas e o 3º par de folhas (não tratadas), foram inoculados com *A. solani*. A suspensão de esporos foi preparada com adição de 10 mL de água deionizada em placa de Petri contendo o patógeno com 30 dias de crescimento em meio de cultura suco V8-ágar. A suspensão foi filtrada em gaze e a concentração determinada em câmara de Neubauer, ajustando-a para 1×10^4 esporos mL⁻¹. A suspensão foi aplicada nas

folhas de tomateiro com auxílio de borrifador, até o ponto de escorrimento, sendo mantida em câmara úmida por 12 horas com auxílio de saco plástico.

As avaliações de severidade da pinta preta causada por *A. solani* ocorreram a cada dois dias, iniciando-se sete dias após a inoculação do fungo. As folhas do tomateiro foram fotografadas e analisadas no software Quant (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), no qual foi calculada a severidade da doença. A área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD) foi calculada pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977), com base na severidade média da doença por planta, o número de avaliações e o intervalo entre duas aplicações, por meio da fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=0}^n \left(\frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$$

Onde, n = número de observações; Y_i = severidade da doença na “i”-ésima observação; X_i = tempo em dias na “i”-ésima observação.

Para avaliação da atividade enzimática, mudas de tomate foram cultivadas conforme experimento anterior, utilizando a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial. Após 30 dias do transplante, foram coletados discos de 1 cm de diâmetro do tecido vegetal nas folhas tratadas (2º par de folhas) e não tratadas (3º par de folhas), no intervalo de 0 h (momento do tratamento), 24 h, 48 h, 72 h (momento da inoculação), 96 h, 120 h e 144 h após os tratamentos. As coletas também foram realizadas em plantas não tratadas e que foram apenas inoculadas com o patógeno. Cada amostra coletada foi acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C para posterior análise bioquímica.

Os discos foliares foram homogeneizados mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), em almofariz de porcelana. O homogenato foi centrifugado a 20000g durante 25 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático.

As análises bioquímicas foram realizadas conforme metodologia descrita por Hammerschmidt, Nucle e Kuc (1982) para análise da atividade de peroxidase; Duangmal e Apenten (1999) para atividade de polifenoloxidase; e Umesha (2006) para determinação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). O conteúdo proteico foi determinado de acordo com procedimento descrito por Bradford (1976).

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, submetidos à análise de regressão com 5% de probabilidade de erro para as concentrações de óleo essencial. Os dados enzimáticos foram analisados pelo teste de Tukey a 5%, ambos com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). O fungicida foi comparado com os demais tratamentos pelo teste de Dunnett, adotando-se nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do software estatístico Genes (CRUZ, 2006).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro, ocorrendo efeito dose-dependente para as concentrações do óleo essencial de bergamota. Redução linear foi observada para o crescimento micelial de *A. solani*, conforme pode ser observado na Figura 1.

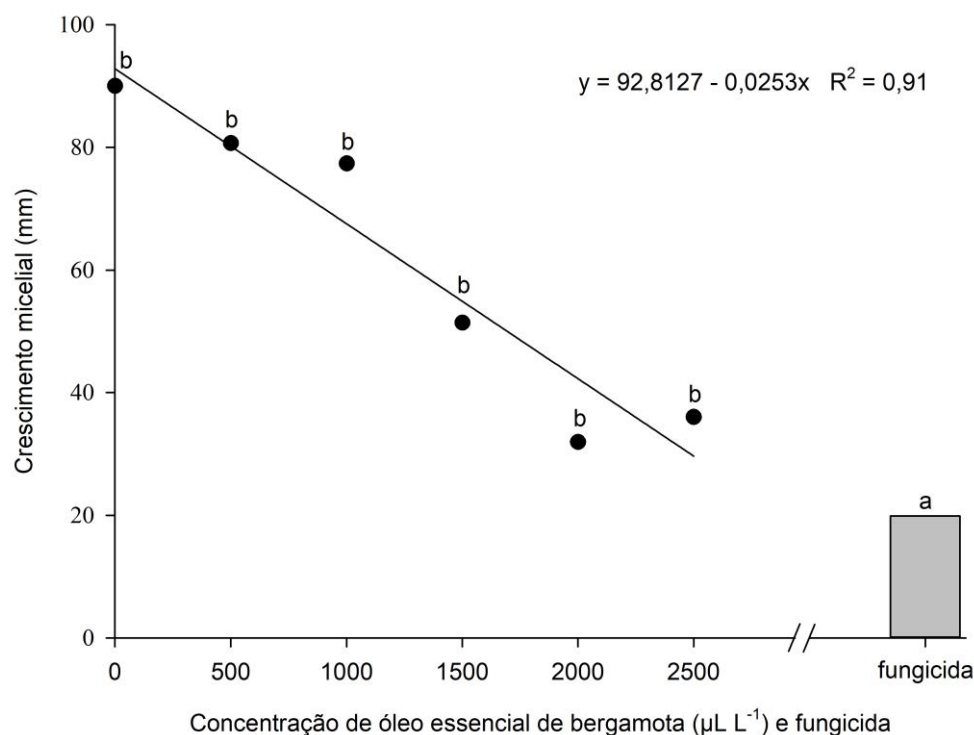


Figura 1 - Crescimento micelial (mm) de *Alternaria solani* em presença de concentrações de óleo essencial de bergamota (µL L⁻¹) e fungicida, no 10^o dia de avaliação. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

A concentração de 2500 µL L⁻¹ inibiu 68,15% do crescimento micelial do patógeno, apresentando-se como a concentração de óleo essencial de bergamota

mais eficaz do experimento, seguido das dosagens de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (54,52%), 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ (40,89%), 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (27,26%) e a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ que inibiu o crescimento micelial da *A. solani* em 13,63%. Dessa forma, o óleo essencial de bergamota apresentou-se efetivo para inibir o crescimento micelial do patógeno em estudo. O fungicida apresentou inibição do patógeno correspondente a 78,57%, sobressaindo-se estatisticamente dos demais tratamentos.

O efeito antifúngico sobre a *A. solani* pelo óleo essencial de bergamota pode ser explicado pela sensibilidade do fungo quando em contato com os princípios ativos do óleo. Estudos indicam que os principais componentes do óleo essencial de bergamota são o limoneno e o linalol (TUNDIS et al., 2012), sendo esses os possíveis responsáveis pelo potencial de inibição sobre o patógeno.

Diante dos dados, o crescimento micelial do patógeno em estudo pode ser inibido em 100% quando exposto à concentração calculada de 3668 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de bergamota, embora essa concentração esteja fora do intervalo estudado nesta pesquisa. Estes dados são condizentes com Pires e Piccoli (2012), em que os óleos essenciais do gênero *Citrus* (*C. limonia*, *C. aurantifolia* e *C. latifolia*) foram promissores na atividade antifúngica contra *Penicillium expansum* na concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$, a qual apresentou inibição total do crescimento micelial do patógeno, comprovando assim a efetividade dos óleos do gênero *Citrus* como agentes antimicrobianos.

O controle de *A. solani* do tomateiro com óleos essenciais vem sendo estudado por diversos autores. A caneleira-verdadeira inibiu 98,47% do crescimento do patógeno com concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (TOMAZONI et al., 2013). Os óleos de *Pinus elliottii* (1500 $\mu\text{L L}^{-1}$) e *Pinus taeda* (5000 $\mu\text{L L}^{-1}$) apresentaram inibição do crescimento micelial de *A. solani* em 14,31% e 19,51%, respectivamente, no 14º dia de avaliação (TOMAZONI et al., 2014).

O crescimento micelial diário do patógeno de acordo com os tratamentos pode ser observado na Figura 2. As concentrações de óleo essencial de bergamota de 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ retardaram o crescimento micelial, porém, no 19º dia de avaliação, o patógeno atingiu o crescimento semelhante à concentração 0 $\mu\text{L L}^{-1}$. O fungicida impediu o crescimento micelial do patógeno, não apresentando evolução após o 9º dia.

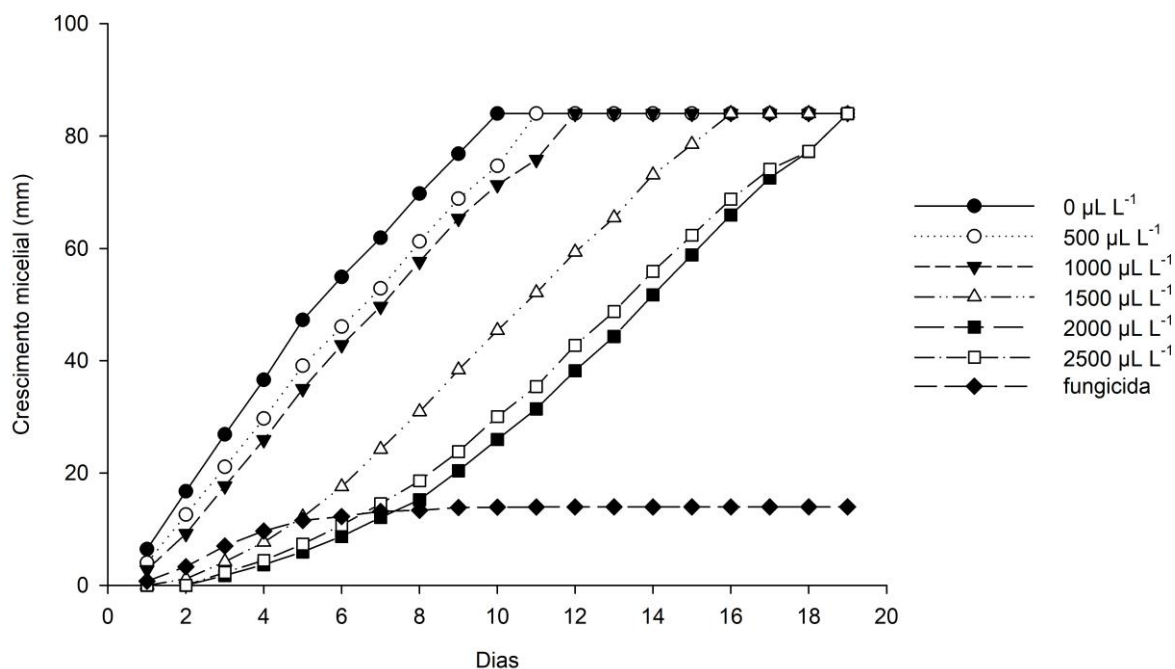


Figura 2 - Crescimento micelial (mm) de *Alternaria solani* de acordo com os dias de avaliação, submetido a dosagens de óleo essencial de bergamota ($\mu\text{L L}^{-1}$) e fungicida.

As concentrações de 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentam quantidades maiores de componentes no óleo essencial que podem ter retardado o crescimento de *A. solani*, uma vez que o crescimento de um patógeno está diretamente ligado às condições de exposição, podendo ser prejudicado ou favorecido. Sugere-se que sucessivas aplicações de óleo essencial de bergamota a campo podem reduzir o desenvolvimento do micélio do patógeno, amenizando assim a destruição foliar do tomateiro, aumentando a efetividade do óleo essencial de bergamota.

O índice de crescimento micelial de *Alternaria sp.* e *Alternaria carthami* submetidos às concentrações de óleo essencial de candeia e alecrim foram avaliados por Hillen et al. (2012). Os autores observaram que concentrações a partir de 3000 $\mu\text{L L}^{-1}$ inibem totalmente o crescimento micelial da *Alternaria sp.*, e as concentrações a partir de 5000 $\mu\text{L L}^{-1}$ resultaram na inibição micelial da *A. carthami*, para ambos os óleos essenciais.

O índice de crescimento micelial de *Botrytis cinerea* isolado de morango, submetido a concentrações de 125 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleos essenciais de laranja e tangerina, ambos pertencentes ao gênero *Citrus*, foi avaliado por Lorenzetti et al. (2011). Os autores observaram que os óleos essenciais apresentaram pouca

atividade antifúngica sobre o crescimento do patógeno, não se diferenciando da testemunha. Esses resultados equiparam-se ao presente estudo, onde as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram crescimento micelial semelhante à concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Ao término da avaliação do crescimento micelial foram quantificados os esporos presentes em cada tratamento, sendo determinada a esporulação levando em consideração a área micelial. A esporulação obtida apresentou comportamento quadrático quando submetido ao aumento da concentração de óleo essencial de bergamota (Figura 3).

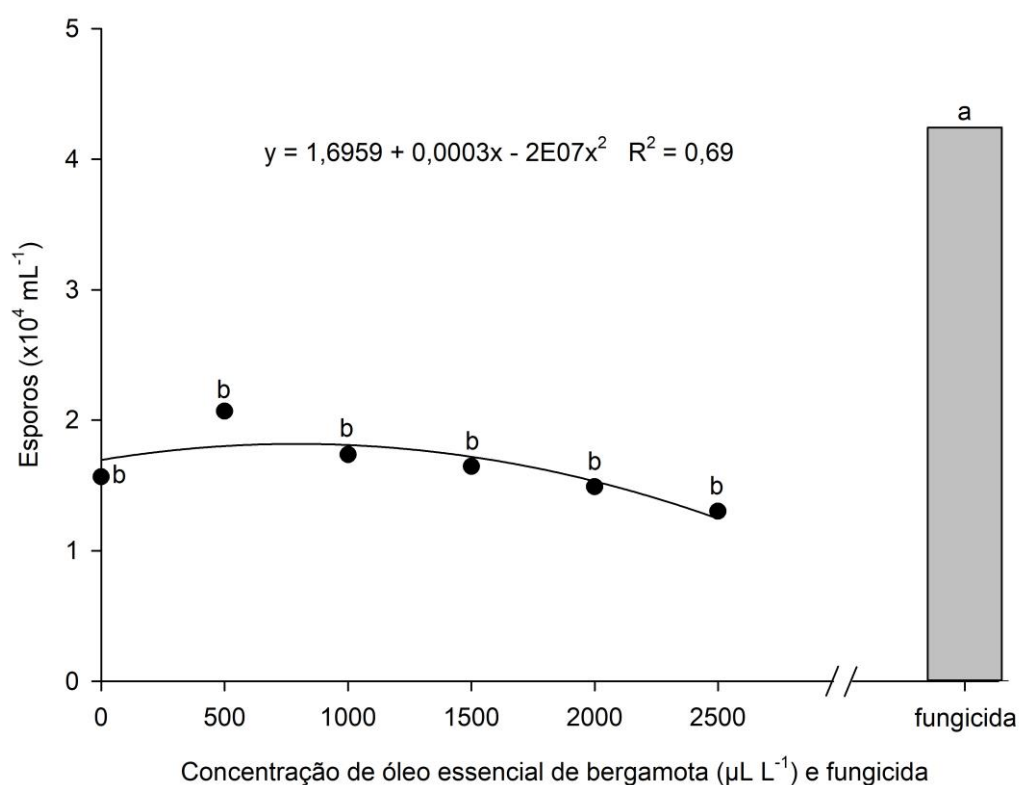


Figura 3 - Esporulação do fungo *Alternaria solani* submetido a dosagens de óleo essencial de bergamota e fungicida. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

As concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de bergamota estimularam a esporulação de *A. solani* em 5,9%. A concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou semelhança com a concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$. A diminuição da esporulação ocorreu quando o patógeno foi submetido às concentrações de 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$, reduzindo em 11,79% e 29,48%, respectivamente, a produção de estruturas reprodutivas em comparação à concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$.

A redução da esporulação de *A. solani* em tomateiro por meio da utilização de óleo essencial é benéfica para as plantas, uma vez que resultará em quantidades inferiores de propágulos disponíveis no ambiente capazes de causar epidemias.

Com o aumento das concentrações, conseqüentemente ocorreu o aumento dos princípios ativos nos óleos essenciais, que por sua vez podem ter desfavorecido a esporulação do patógeno. Rodrigues et al. (2010) afirmam que os fatores de nutrição, temperatura, luz e condições de estresse podem induzir esporulação fúngica.

O tratamento com fungicida apresentou acréscimo de esporos em 150,18% em comparação à concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$. Esse fato pode estar diretamente ligado ao estresse a que o patógeno foi submetido quando teve seu crescimento micelial interrompido, apresentando como medida de sobrevivência uma quantidade maior de estruturas reprodutivas.

Lorenzetti et al. (2011) avaliaram a produção de esporos de *B. cinerea* submetidos às concentrações de 125 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de laranja e tangerina, ambos pertencentes ao gênero *Citrus*. As concentrações não apresentaram diferença significativa com a testemunha, assemelhando-se ao presente trabalho, onde a redução da esporulação foi constatada apenas nas concentrações superiores, correspondentes a 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Na Figura 4 pode-se observar o efeito quadrático para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas tratadas (2º par de folhas) e não tratadas (3º par de folhas) de tomateiro, comprovando o efeito do óleo essencial de bergamota para controle da doença.

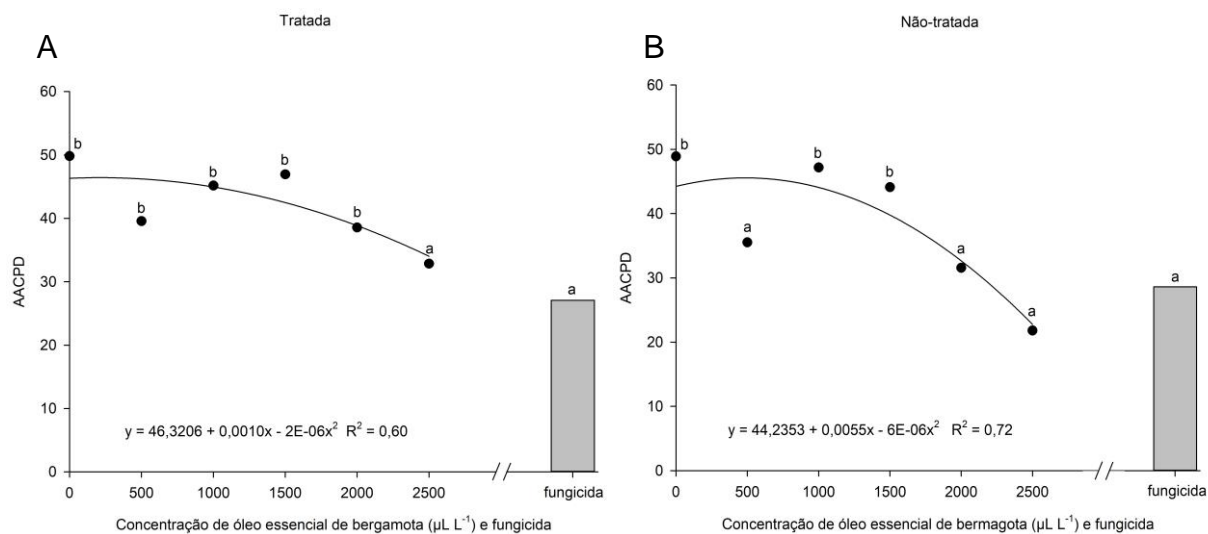


Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tomateiro tratada (A) e não tratada (B) com óleo essencial de bergamota e fungicida, e inoculadas com *Alternaria solani*. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

A concentração de $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de bergamota reduziu 21,59% da AACPD nas folhas tratadas, assemelhando-se ao fungicida pelo teste de Dunnett, que apresentou 41,53% de decréscimo. Para as folhas não tratadas, o fungicida apresentou redução de 35,32% da AACPD, assemelhando-se com as concentrações de $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ com 53,69% e $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ que correspondeu a 29,39% de diminuição da AACPD. A redução da doença nas folhas de tomate não tratadas pode ser explicada pela indução de resistência sistêmica, onde enzimas de defesa foram ativadas.

A menor AACPD é resultado de um avanço lento da destruição das folhas de tomateiro infectadas com *A. solani*. Esse retardamento provocado pela ação do óleo essencial de bergamota, tanto na proteção local quanto sistêmica, possibilita às plantas uma área foliar sadia por mais tempo, permitindo menores perdas no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da cultura do tomate, podendo atuar mesmo em folhas não atingidas pela pulverização.

O princípio ativo do fungicida, azoxistrobina, possui translocação nos tecidos classificada como mesostêmico, apresentando afinidade com a superfície das folhas, podendo ser absorvida pela camada de cera (SILVA JÚNIOR; BEHLAU, 2018). Devido a essa característica, as folhas não tratadas com fungicida apresentaram resultados semelhantes da AACPD em comparação às folhas tratadas. A ação do

fungicida como indutor de resistência também pode ter originado este resultado semelhante entre folhas tratadas e não tratadas com fungicida.

O número de lesões de pinta preta do tomateiro em folhas tratadas e não tratadas com extrato bruto aquoso de cânfora e capim-limão foram avaliados por Itako et al. (2008). Os autores observaram que não ocorreu proteção local dos extratos, pois o número de lesões não se diferiu estatisticamente entre os tratamentos com extratos e a testemunha. Contudo, foi constatado efeito sistêmico, pois as folhas não tratadas apresentaram significativas reduções do número de lesões de pinta preta. Estes resultados comprovam também a ação de derivados de plantas medicinais no controle de *A. solani* no tomateiro, assim como o presente estudo.

Ranieri et al. (2015) avaliaram as alterações físicas e químicas de frutos de tomate na pós-colheita tratados com compostos de plantas medicinais. Os autores observaram que a incidência natural de *A. solani* reduziu em até 40% quando tratado com óleo essencial de bergamota na concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$, comprovando o potencial do óleo essencial de bergamota na redução da incidência da doença, conforme o presente estudo.

A atividade enzimática de peroxidase nas folhas de tomateiro sofreu alteração com a aplicação do óleo essencial de bergamota. Ao nível de 5% de probabilidade de erro, a atividade de peroxidase em folhas de tomateiro mostrou-se superior no 2º e 3º par de folhas, visto que o mesmo não foi observado para a testemunha, conforme a Figura 5.

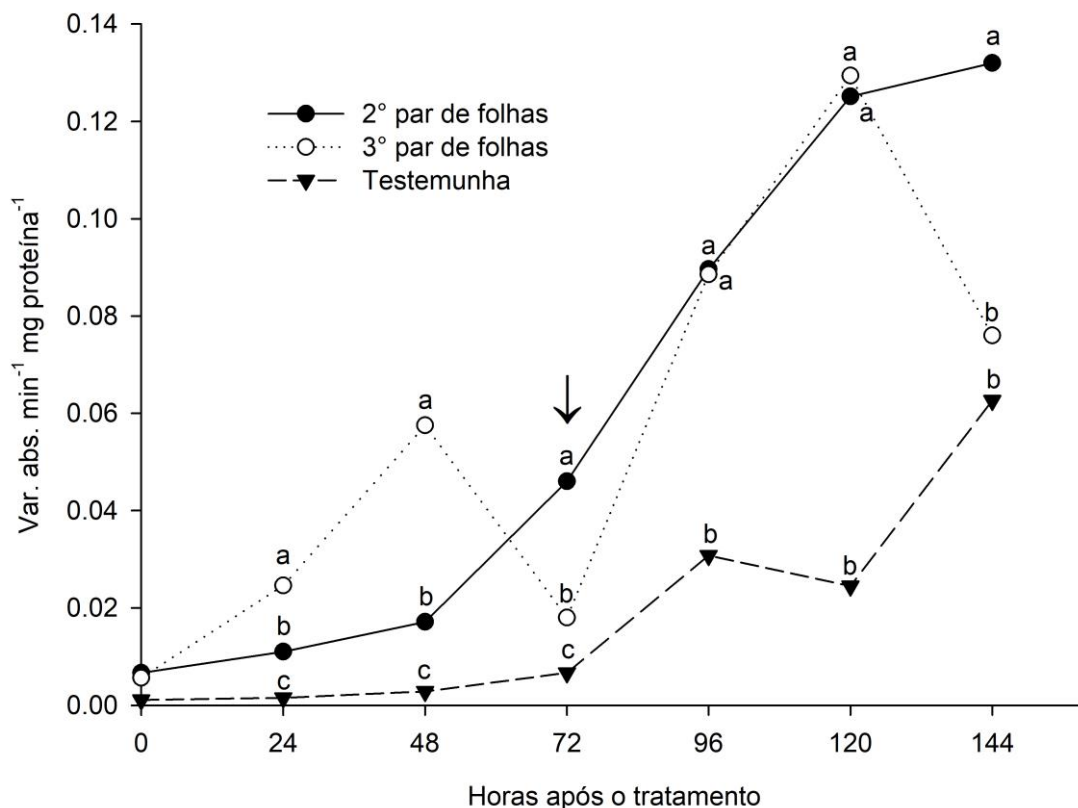


Figura 5 - Atividade de peroxidase em tomateiro tratada com $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de bergamota. Os tratamentos foram realizados no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A aplicação do óleo essencial promoveu incremento da atividade de peroxidase para o 2º e 3º pares de folhas do tomateiro nas 24 e 48 horas após o tratamento. Posteriormente, no tempo de 72 horas, coincidindo com a inoculação do patógeno, ocorreu um aumento acentuado da atividade enzimática para ambas as folhas, porém, a testemunha apresentou um lento acréscimo. A atividade enzimática de peroxidase apresentou significativo aumento ainda nos tempos de 96 e 120 horas para os 2º e 3º pares de folhas, demonstrando um processo de indução de resistência.

De acordo com Stangarlin et al. (2011b) a atividade de peroxidase altera a taxa de lignina, por meio da oxidação de álcoois fenólicos, atuando de forma preventiva. Em consequência, dificulta a penetração do patógeno pela parede

celular, agindo como um indutor de resistência, proporcionando mais resistência contra toxinas liberadas pelos patógenos.

A atividade da peroxidase logo após o tratamento, mesmo que baixa, pode ter relação com a pré-disposição à resistência, acarretando um maior incremento com a chegada do patógeno, quando inicia o processo infeccioso (LORENZETTI et al., 2018).

Um incremento significativo na atividade de peroxidase foi observado por Lucas (2012) ao avaliar as respostas de defesa induzidas por óleo essencial de capim limão e acibenzolar-S-metil (ASM) em tomateiro inoculado com *A. solani*. O autor observou um incremento correspondente a 82,9% e 164% para o óleo essencial e o tratamento com ASM, respectivamente, em comparação às plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram observados por Silva, Pascholati e Bedendo (2007) quando avaliaram a indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de cogumelos contra murcha bacteriana. Os autores constataram um significativo aumento da peroxidase nas folhas de tomateiro com a inoculação do patógeno, que ocorreu 72 horas após o tratamento.

Araujo e Menezes (2009) observaram que o aumento da atividade de peroxidase em tomateiro pode ser provocado pelo tratamento com *Bacillus subtilis* e acibenzolar-S-Metil (ASM). Desta maneira, tanto agentes bióticos quanto abióticos podem promover a atividade de peroxidase, porém, ainda são escassos os estudos com ativação de enzimas de defesa de plantas com a utilização de óleo essencial de bergamota.

A atividade de polifenoloxidase em folhas de tomateiro apresentou diferença significativa quando tratada com óleo essencial de bergamota, sendo observado um pico da atividade apenas para o 2º par de folhas de tomate em 96 horas após o tratamento, apresentando acréscimo de 175,61% de atividade enzimática (Figura 6).

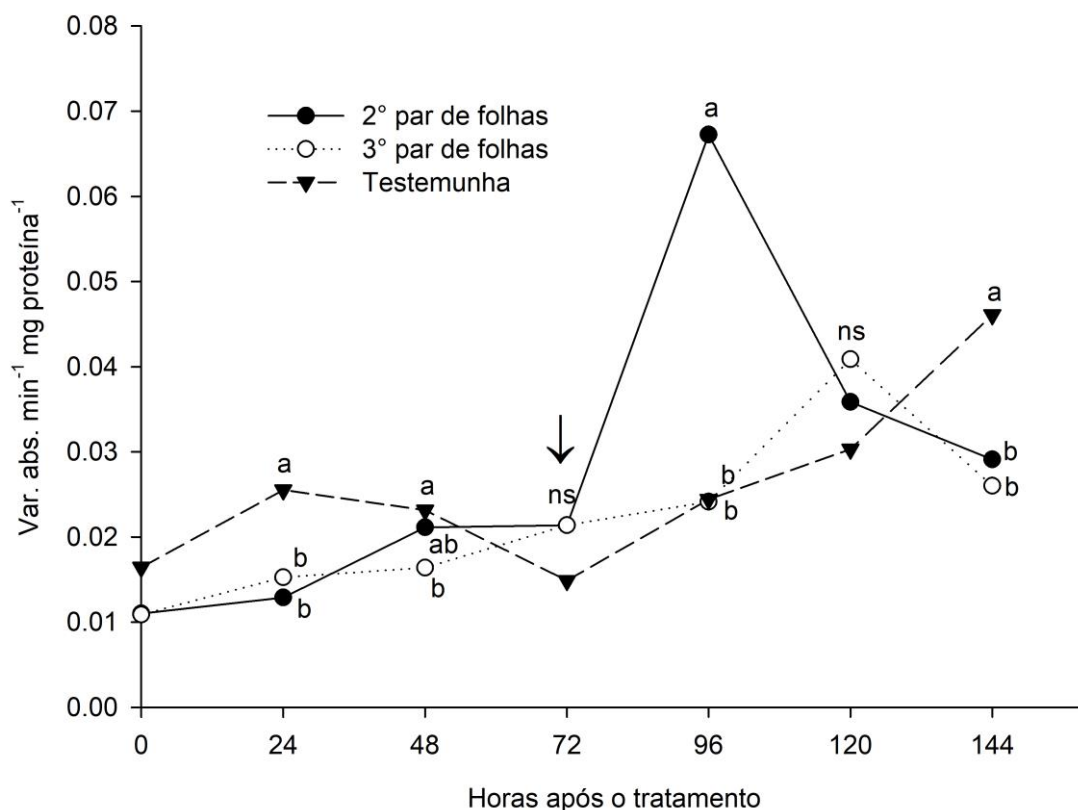


Figura 6 - Atividade de polifenoloxidase em tomateiro tratada com 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de bergamota. Os tratamentos foram realizados no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A aplicação de óleo essencial de bergamota gerou supressão na atividade de polifenoloxidase no 2º e 3º pares de folhas do tomateiro nas 24 horas após o tratamento com óleo essencial de bergamota. Resultado semelhante a Silva, Pascholati e Bedendo (2007) que constataram uma diminuição nas primeiras horas de avaliação da atividade de polifenoloxidase nas plantas de tomateiro tratadas com indutor abiótico e inoculadas com *Ralstonia solanacearum*.

Contudo, no tempo de 96 horas observa-se incremento da atividade enzimática no 2º par de folhas, devido ao processo infeccioso, ao processo de indução da resistência e aos componentes químicos do óleo, ocorrendo um efeito local. Segundo Portz et al. (2011), a colonização do patógeno gera uma elevada atividade enzimática, devido aos mecanismos de defesa que são ativados de modo mais acentuado neste momento pós inoculação.

A polifenoloxidase é uma enzima oxidativa participante na reação de defesa vegetal contra fitopatógenos, atuando na formação da lignina e de compostos oxidativos. Por sua vez, essa enzima contribui para a formação de barreira de defesa, fortalecendo a parede celular e agindo também na ação direta sobre os patógenos. O incremento desta enzima normalmente ocorre em tecidos infectados (AGRIOS, 2005), conforme o presente estudo.

A atividade de fenilalanina amônia-liase no 2º par de folhas, 3º par de folhas e testemunha, pode ser observado na Figura 7.

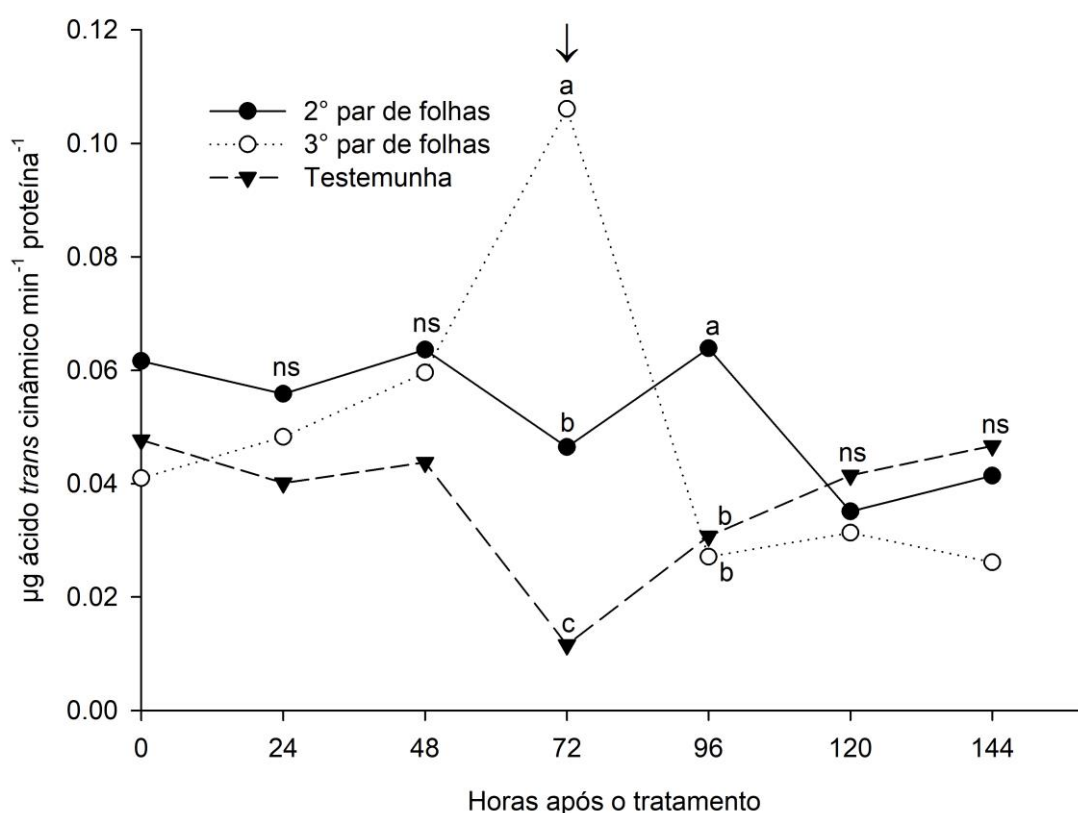


Figura 7 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em tomateiro tratada com 2500 µL L⁻¹ de óleo essencial de bergamota. Os tratamentos foram realizados no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A aplicação de óleo essencial de bergamota não alterou a atividade enzimática da FAL nas primeiras avaliações, correspondente a 24 e 48 horas. Com a inoculação do patógeno, observa-se um elevado incremento na atividade enzimática

para o 3º par de folhas, sobressaindo-se da testemunha, na qual ocorreu o decréscimo desta atividade.

No tempo de 96 horas, a atividade de FAL é superior na 2ª folha, onde as folhas foram tratadas e inoculadas, apresentando uma indução de resistência para esse tempo, com incremento de 107,97% da atividade enzimática. Posteriormente, nos tempos 120 e 144 horas, ambas as folhas não apresentaram diferença em relação à testemunha, demonstrando pouca efetividade do óleo essencial de bergamota na ativação da enzima fenilalanina amônia-liase.

A FAL é uma enzima de elevada importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos, responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, desencadeando reações metabólicas que, por sua vez, geram produtos baseados em fenilpropanos, incluindo a lignina (STANGARLIN et al., 2011b).

Silva, Pascholati e Bedendo (2007) analisaram a atividade da FAL em folhas de tomateiro tratadas com ASM e extrato aquoso de cogumelos, inoculadas com *Ralstonia solanacearum*. Os autores observaram uma diminuição da atividade enzimática nas plantas tratadas com os indutores e inoculadas com a bactéria, indicando, portanto, que a atividade da FAL é dependente do patossistema.

2.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de bergamota apresentou atividade antifúngica a *Alternaria solani* e controle da pinta preta do tomateiro, o que pode ter ocorrido por atividade antimicrobiana direta ou por indução de resistência envolvendo as enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.

ARAUJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2006.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e na comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

INCAPER. **Tomate**. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Vitória: Incaper, 2010.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016, p. 697-735.

ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 619-627, 2011.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

PORTZ, R. L.; FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; FROMM, J.; ERNST, D.; PASCHOLATI, S. F.; OSSWALD, W. F. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. **Forest Pathology**, v. 41, p. 202-211, 2011.

RANIERI, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; OLIVEIRA, J. S. B.; MESQUINI, R. M.; CLEMENTE, E.; CRUZ, M. E. S. Utilização de compostos bioativos de plantas medicinais na pós-colheita de tomate. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 160-165, 2015.

RODRIGUES, T. T. M. S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 203-212, 2010.

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

SILVA JÚNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 239-260.

SILVA, R. F., PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz: Formatex Research Center, 2011a, p. 1033-1042.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011b.

TOMAZONI, E. Z.; GIANI, S. G.; RIBEIRO, R. T. S.; PAULETTI, G. F.; SCHWAMBACH, J. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, p. 1-5, 2013.

TOMAZONI, E. Z.; PAULETTI, G. F.; RIBEIRO, R. T. S.; SCHWAMBACH, J. Atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* sobre o fungo patógeno de tomateiro *Alternaria solani* sorauer. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2014.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; COLICA, C.; MENICHINI, F. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 40-46, 2012.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; ZAMBOLIM, E. M.; ALVARENGA, M. A. R. Manejo Integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M. A. R. (Org.) **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004, p. 217.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I. F.; LIBERATO, J. R. Quant: a software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch New Zealand: Plant Pathology Society, 2003. p. 105.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P. A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000, p. 699-756.

3 ARTIGO II - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA

RESUMO: A pinta preta do tomateiro causa prejuízos para os produtores afetando diretamente a qualidade do fruto, sendo uma das culturas que mais utiliza fungicida. Uma alternativa ao uso de agrotóxicos é a utilização de óleos essenciais que podem atuar na defesa contra fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a atividade de enzimas de defesa no tomateiro tratado com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*). Discos miceliais de *Alternaria solani* foram adicionados em placas de Petri, com os tratamentos 0, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além de um tratamento padrão com fungicida (azoxistrobina + difenoconazol), sendo avaliado o crescimento micelial e esporulação. Plantas de tomate foram cultivadas em casa de vegetação e aplicados os tratamentos citados no segundo par de folhas, e, após 72 horas, foi inoculado o patógeno nas folhas tratadas (segundo par de folhas) e nas não tratadas (terceiro par de folhas). A avaliação de severidade foi expressa através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Foi avaliada a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase com a concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$. O aumento das concentrações do tratamento promoveu o decréscimo do crescimento micelial e esporulação do patógeno. A AACPD foi reduzida em 38,14% nas folhas tratadas e 51,32% nas não tratadas, ambas com 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. Incrementos da atividade de polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase foram observados nas folhas tratadas e nas não tratadas. O óleo essencial de citronela pode ser uma alternativa no controle da pinta preta do tomateiro, tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência.

Palavras-chave: Controle alternativo. Indução de resistência. *Cymbopogon nardus*. *Alternaria solani*.

ARTICLE II - ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CONTROL OF THE EARLY BLIGHT OF TOMATO BY ESSENTIAL OIL OF CITRONELLA

ABSTRACT: The early blight of tomato causes damages to the producers directly affecting the quality of the fruit, being one of the crops that uses more fungicide. An alternative to the agrochemicals is the use of essential oils that can act in defense against phytopathogens. The objective was to evaluate the antifungal activity and the control of the early blight of tomato treated with citronella essential oil (*Cymbopogon nardus*). Mycelial disks of the *Alternaria solani* were added in Petri dishes, with treatments 0, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ of essential oil, besides one treatment with fungicide (azoxystrobin + diphenconazole), and mycelial growth and sporulation were evaluated. Tomato plants were cultivated under greenhouse conditions and the treatments were applied in the second pair of leaves and after 72 hours the pathogen was inoculated on the treated (second pair) and untreated (third pair). The severity assessment was expressed through the area under the disease progress curve (AUDPC). The enzymatic activity of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase with the concentration of 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ were evaluated. The increase of the concentrations of the treatment favored the decrease of the mycelial growth and sporulation of the pathogen. The AUDPC was reduced by 38.14% in the treated leaves and 51.32% in the untreated, both with 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. An increase in the activities of polyphenoloxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase were observed in the treated and untreated leaves. The essential oil of citronella can be an alternative in the control of the early blight of tomato, both by antimicrobial activity and resistance induction.

Key words: Alternative control. Resistance induction. *Cymbopogon nardus*. *Alternaria solani*.

3.1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das espécies cultivadas mais sujeitas à ocorrência de doenças, as quais geram significativas perdas na produção. O fungo *Alternaria solani*, agente causal da pinta preta, também conhecida por mancha de alternaria, é uma doença foliar que ocorre em todas as regiões onde se cultiva a hortaliça (FILGUEIRA, 2008). O patógeno causa epidemias com temperaturas entre 25 e 30 °C e umidade relativa elevada, com grande potencial de destruição foliar (INOUE-NAGATA et al., 2016; VALE et al., 2000).

As substâncias oriundas de extratos vegetais e óleos essenciais são opções de controle que têm como objetivo reduzir e/ou amenizar o uso de agrotóxicos, pois o uso intensivo destes produtos químicos gera problemas ambientais. Dentre as adversidades desses produtos estão a contaminação dos alimentos, do solo e da água; a intoxicação dos agricultores e aplicadores que possuem contato com produtos químicos; a seleção de fitopatógenos resistentes e erradicação de microrganismos benéficos do solo (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

O extrato bruto e os óleos essenciais de plantas medicinais possuem potencial no controle de fitopatógenos, através da ação fungitóxica direta e também pela indução de resistência em diversos patossistemas. A composição dos óleos é muito ampla devido a sua diversidade, sendo considerados fontes de compostos biologicamente ativos, principalmente contra patógenos e insetos (STANGARLIN et al., 2011).

O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) apresenta atividade repelente, ação bacteriana e fungicida. A produção de seus metabólitos secundários pode variar com as relações ecológicas e genéticas da planta. Os compostos presentes neste óleo, como os monoterpenos citronelal e geraniol, atuam na defesa da planta e podem inibir o crescimento de fungos (CASTRO et al., 2007).

Algumas pesquisas comprovam a eficiência do óleo essencial de citronela para minimizar seus efeitos em alguns patossistemas, como: *Botrytis cinerea* em morangueiro (LORENZETTI et al., 2011); *Sphaceloma ampelinum* em uva (FIALHO; PAPA, 2015); *Colletotrichum graminicola*, causador da antracnose em sorgo (BRUM, 2012); *Cercospora coffeicola* em cafeeiro (PEREIRA et al., 2011), entre outros.

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a ativação das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase na cultura do tomateiro tratado com óleo essencial de citronela.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento indireto do patógeno de *Alternaria solani* foi realizado a partir de frutos de tomate sintomáticos, dos quais fragmentos do material vegetal foram cortados e depositados em placa de Petri com meio de cultura, sendo mantidos a 25 °C e escuro em BOD. O isolado foi preservado pelo método de Castelani e tubo de ensaio com meio de cultura suco V8-ágar.

O óleo essencial de citronela (*C. nardus*) foi obtido em farmácia de manipulação. O delineamento experimental inteiramente casualizado foi adotado com sete tratamentos: 0; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além do tratamento padrão com fungicida (azoxistrobina + difenoconazol), com cinco repetições cada tratamento.

Os testes de crescimento micelial e esporulação foram conduzidos para avaliar a atividade antifúngica sobre o patógeno, portanto, o meio de cultura suco V8-ágar foi preparado e autoclavado (121 °C/15 min). Os tratamentos foram adicionados ao meio de cultura ainda fundente, sendo adicionado detergente Tween 20 na proporção 1:1 (v/v) para a homogeneização do meio de cultura com o óleo essencial de citronela. A concentração de fungicida foi utilizada conforme a recomendação do fabricante, correspondendo a 40 mL 100 L^{-1} de água.

Após a solidificação do meio de cultura em cada placa de Petri (90 mm de diâmetro), foi depositado disco micelial de 6 mm da colônia com 14 dias de idade no centro das placas. Em seguida, as mesmas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara tipo BOD a 25 °C e escuro.

A eficiência da atividade antifúngica foi avaliada por medições diárias do diâmetro das colônias (mm), em dois eixos perpendiculares entre si, iniciando 24 horas após a instalação do experimento até o momento que um tratamento atingiu toda a superfície da placa de Petri, calculando assim o crescimento micelial de todos os tratamentos. A relação entre o crescimento micelial do patógeno e os dias de avaliação foi realizada por medições diárias até o momento em que todas as colônias cobriram toda a superfície do meio de cultura ou não apresentaram evolução do crescimento micelial no decorrer dos dias.

Ao término da avaliação de crescimento micelial foi analisada a esporulação do fungo. Para isto, foram adicionados 10 mL de água deionizada em cada placa de Petri e após a raspagem da colônia com auxílio de uma lâmina de vidro, a suspensão foi filtrada em gaze, sendo determinado o número de esporos por mL em câmara de Neubauer. A esporulação foi calculada com base na área micelial de cada tratamento.

O experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação localizada em Toledo (PR). O delineamento experimental foi blocos casualizados, com os mesmos tratamentos citados anteriormente e quatro repetições.

A adubação do solo foi realizada conforme análise química do mesmo e necessidade da cultura. Sementes de tomate Caqui, cultivar Odete, foram semeadas em bandeja de poliestireno expandido de 200 células contendo substrato comercial. As mudas foram transplantadas aos 30 dias após a semeadura para cultivo em solo e suplementadas com fertirrigação.

Após 30 dias do transplante das mudas, o segundo par de folhas na parte inferior da planta foi tratado com o fungicida e o óleo nas concentrações descritas anteriormente. Para obter mistura homogênea entre o óleo essencial e a água foi utilizado Tween 20 na proporção 1:1 (v/v).

Após 72 h da aplicação dos tratamentos, o segundo par de folhas tratadas e o terceiro par de folhas (não tratadas) inferiores, foram inoculados com *A. solani*. A suspensão de esporos foi preparada com adição de 10 mL de água deionizada em placa de Petri contendo o patógeno com 30 dias de crescimento em meio de cultura suco V8-ágar. A suspensão foi ajustada para 1×10^4 esporos mL^{-1} . A suspensão de esporos foi aplicada nas folhas de tomateiro com auxílio de borrifador, até o ponto de escorrimento, sendo mantida em câmara úmida por 12 horas com auxílio de saco plástico umedecido.

As avaliações de severidade da pinta preta causada por *A. solani* ocorreram a cada dois dias, iniciando-se sete dias após a inoculação do fungo. As folhas do tomateiro foram fotografadas e analisadas no software Quant (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), no qual foi calculada a severidade da doença. A área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD) foi calculada pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977), com base na severidade média da doença por planta, o número de avaliações e o intervalo entre duas aplicações, por meio da fórmula:

$$\text{AACPD} = \sum_{i=0}^n \left(\frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$$

Onde, n = número de observações; Y_i = severidade da doença na “i”-ésima observação; X_i = tempo em dias na “i”-ésima observação.

Para avaliação da atividade enzimática, mudas de tomates foram cultivadas conforme experimento anterior, utilizando a concentração de $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial. Após 30 dias do transplante das mudas, foram coletados discos de 1 cm de diâmetro do tecido vegetal nas folhas tratadas (2º par de folhas) e não tratadas

(3º par de folhas), no intervalo de 0 h (momento do tratamento), 24 h, 48 h, 72 h (momento da inoculação), 96 h, 120 h e 144 h após os tratamentos. As coletas também foram realizadas em plantas testemunhas que foram inoculadas com o patógeno. Cada amostra coletada foi acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C para posterior análise bioquímica.

Os discos foliares foram homogeneizados mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), em almofariz de porcelana. O homogenato foi centrifugado a 20000g durante 25 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático.

Foram analisadas as atividades enzimáticas de peroxidase (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUC, 1982); polifenoloxidase (DUANGMAL; APENTEN, 1999) e fenilalanina amônia-liase (UMESHA, 2006). O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos submetidos à análise de regressão com 5% de probabilidade de erro para as concentrações de óleo essencial. Os dados enzimáticos foram analisados pelo teste de Tukey a 5%, ambos com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). O fungicida foi comparado com os demais tratamentos pelo teste de Dunnett, adotando-se nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do software estatístico Genes (CRUZ, 2006).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial de *A. solani* submetido a concentrações de óleo essencial de citronela apresentou significativas diferenças originando um decréscimo quadrático, apresentando 100% de inibição com a concentração calculada de 2417 $\mu\text{L L}^{-1}$. A concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou inibição total do crescimento micelial do patógeno. A concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou 48,77% de inibição do patógeno; 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ correspondeu a 27,68% e a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou 11,42% de inibição de *A. solani*, conforme a Figura 1.

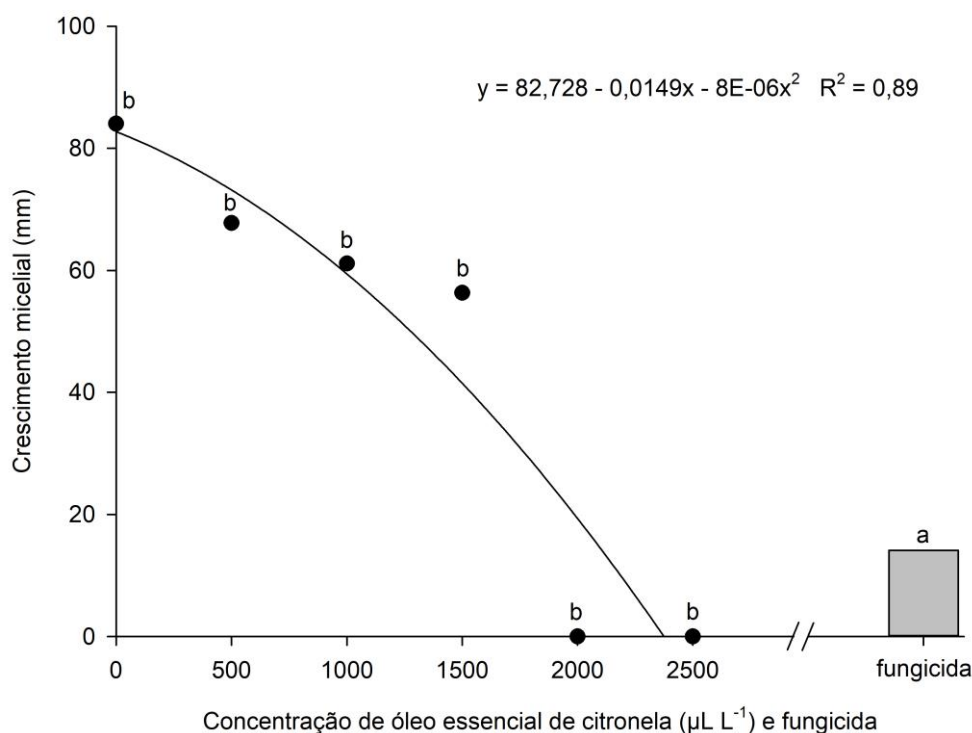


Figura 1 - Crescimento micelial (mm) do fungo *Alternaria solani* em presença de concentrações de óleo essencial de citronela ($\mu\text{L L}^{-1}$) e fungicida, no 11^o dia de avaliação. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

A correlação das maiores inibições do patógeno com as maiores concentrações de óleo essencial de citronela pode estar ligada à quantidade de substâncias do óleo disponíveis em cada tratamento. De acordo com Fiori et al. (2000), a atividade antifúngica dos óleos essenciais pode estar relacionada com sua propriedade hidrofóbica, ou seja, as substâncias dos óleos, em contato com o fungo, promovem a alteração da permeabilidade da membrana plasmática, causando distúrbios estruturais e exposição do conteúdo celular do patógeno.

O efeito antifúngico do óleo essencial de citronela é comprovado por diversos autores em diferenciados patossistemas, conforme o presente estudo. A concentração de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentou inibição de 79% no crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em morangueiro (LORENZETTI et al., 2011). O desenvolvimento de *A. solani*, por sua vez, foi inibida em aproximadamente 30% quando submetida a concentração de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela (LUCAS, 2012).

Fialho e Papa (2015) avaliaram diversos óleos essenciais na inibição do crescimento micelial de *Sphaceloma ampelinum*. Dentre os óleos estudados, a citronela na concentração de $3000 \mu\text{L L}^{-1}$ inibiu 81% do crescimento do patógeno.

Uma concentração superior ($10000 \mu\text{L L}^{-1}$) apresentou 100% de inibição, mostrando o potencial antifúngico do óleo essencial.

O crescimento micelial foi avaliado diariamente, sendo que a *A. solani* submetida à concentração $0 \mu\text{L L}^{-1}$ atingiu toda a superfície da placa de Petri no 11º dia de avaliação. As concentrações superiores, por sua vez, tiveram o crescimento retardado em três dias para a concentração de $500 \mu\text{L L}^{-1}$ e quatro dias para as concentrações de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ e $1500 \mu\text{L L}^{-1}$, que atingiram toda a superfície da placa no 15º dia. O patógeno com as concentrações de $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ não apresentaram crescimento do micélio em nenhum momento do experimento. O fungicida proporcionou um crescimento da *A. solani*, porém a partir do 11º dia tornou-se estável (Figura 2).

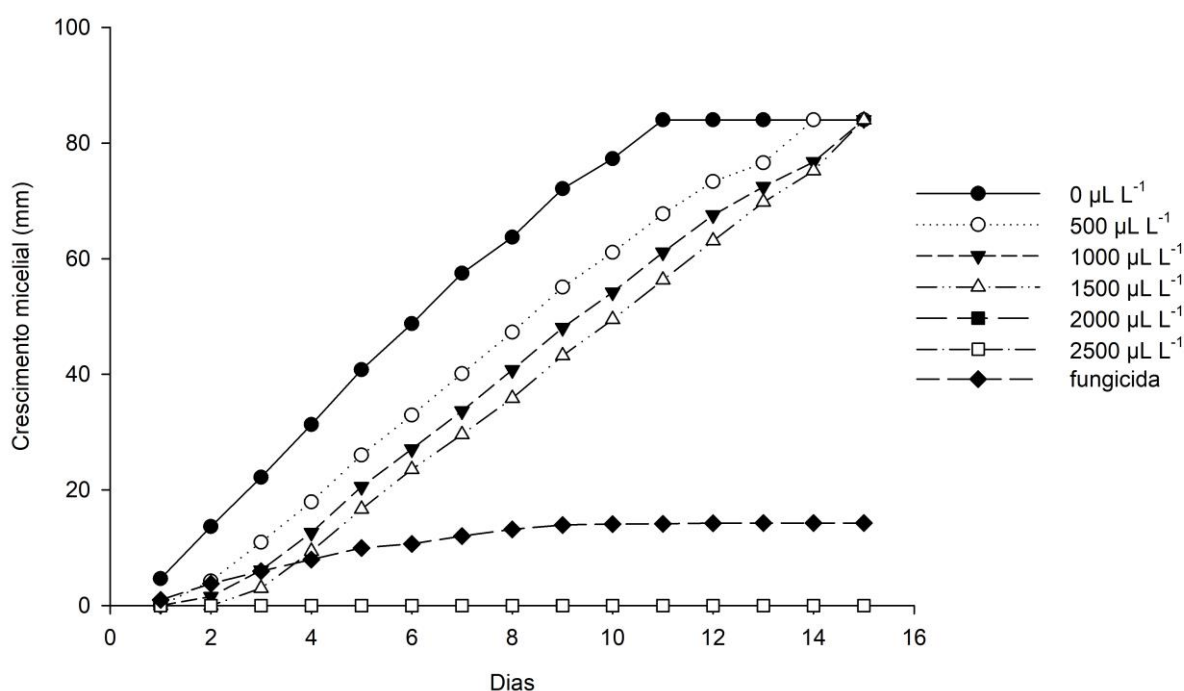


Figura 2 - Crescimento micelial (mm) de *Alternaria solani* de acordo com os dias de avaliação, submetido a dosagens de óleo essencial de citronela ($\mu\text{L L}^{-1}$) e fungicida.

O aumento da concentração do óleo essencial de citronela retardou o crescimento micelial da *A. solani*, uma vez que a concentração de $0 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentou uma taxa de crescimento equivalente a $8,18 \text{ mm dia}^{-1}$, a concentração de $500 \mu\text{L L}^{-1}$ $6,43 \text{ mm dia}^{-1}$ e as concentrações de 1000 e $1500 \mu\text{L L}^{-1}$, 6 mm dia^{-1} , sendo estes resultados semelhantes ao encontrados por Santos et al. (2013), que avaliaram *Helminthosporium* sp. Os autores constataram que o óleo essencial de citronela reduziu a taxa de crescimento do patógeno, sendo que a concentração de

250 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou uma taxa de crescimento correspondente a 7,08 mm dia^{-1} e a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ um menor crescimento, equivalente a 4,11 mm dia^{-1} , sendo o início do crescimento observado após 4 dias da implantação do experimento.

O óleo essencial de citronela pode retardar e impedir também o crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose na cultura do sorgo e *Pyricularia grisea* causador de brusone na cultura do arroz (BRUM, 2012), semelhante ao presente estudo. O autor observou que o crescimento dos patógenos com a concentração de 250 $\mu\text{L L}^{-1}$ iniciou dois dias após a implantação do experimento, enquanto que a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ proporcionou o crescimento dos patógenos somente após o sexto dia. As concentrações maiores, correspondentes a 750, 1000 e 1250 $\mu\text{L L}^{-1}$ inibiram totalmente o crescimento dos patógenos.

A esporulação, avaliada ao término do crescimento micelial, apresentou decréscimo quadrático, sendo que a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou ausência de esporos (Figura 3). A concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou inibição de 55,01% em comparação a concentração 0 $\mu\text{L L}^{-1}$; 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (31,43%) e concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ com inibição de 13,10% da esporulação de *A. solani*. O fungicida apresentou elevada esporulação em comparação à concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$.

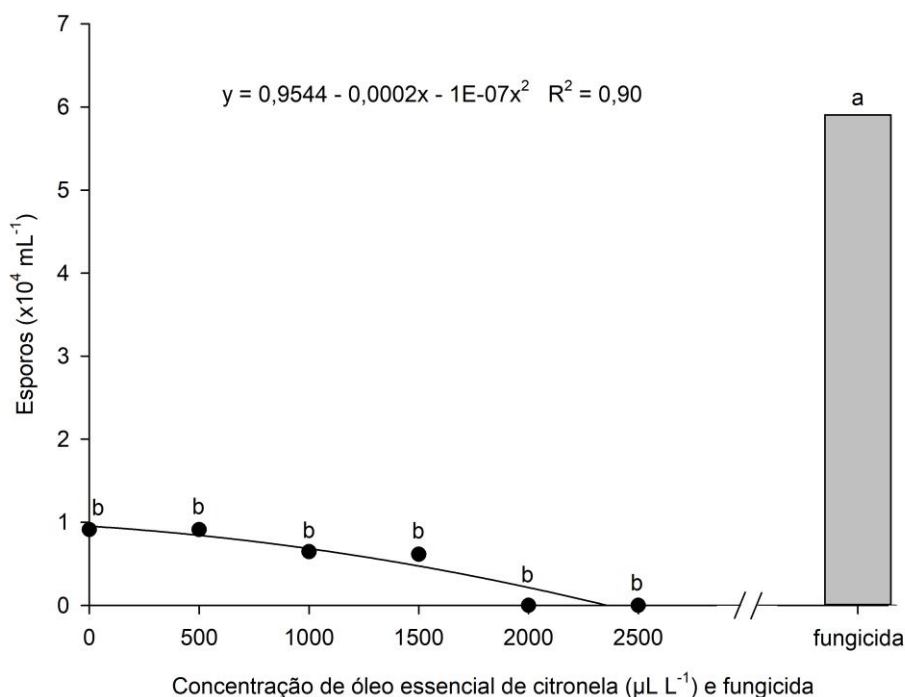


Figura 3 - Esporulação do fungo *Alternaria solani* submetido a dosagens de óleo essencial de citronela e fungicida. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

De acordo com Amorim e Pascholati (2018) a produção de estruturas reprodutivas de um patógeno está ligada diretamente às condições do ambiente em que o mesmo está exposto. Com aumento das concentrações do óleo essencial, consequentemente, o patógeno ficou exposto a uma maior concentração de substâncias presentes no tratamento, que podem ter desfavorecido a produção de esporos do patógeno.

Lorenzetti et al. (2011) observaram uma redução de 22% na produção de estruturas reprodutivas de *B. cinerea*, ao utilizar um tratamento com concentração de 1000 µL L⁻¹ de óleo essencial de citronela. Os autores constataram uma inibição na produção de esporos para os óleos essenciais de canela, capim limão, cravo, eucalipto, menta e palmarosa.

Os óleos de *Cymbopogon winterianus* e *C. citratus* foram eficientes na inibição da produção de esporos de *Fusarium solani*, conforme o aumento das dosagens (CRUZ, 2013). O decréscimo de esporulação proporcionada pelos tratamentos com óleo essencial de citronela é benéfico para as plantas, uma vez que a quantidade de estruturas reprodutivas será inferior, sendo a ocorrência de epidemias menor.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) apresentou um efeito linear dose-dependente para as folhas tratadas (A) e um efeito quadrático para as folhas não-tratadas (B), conforme a Figura 4.

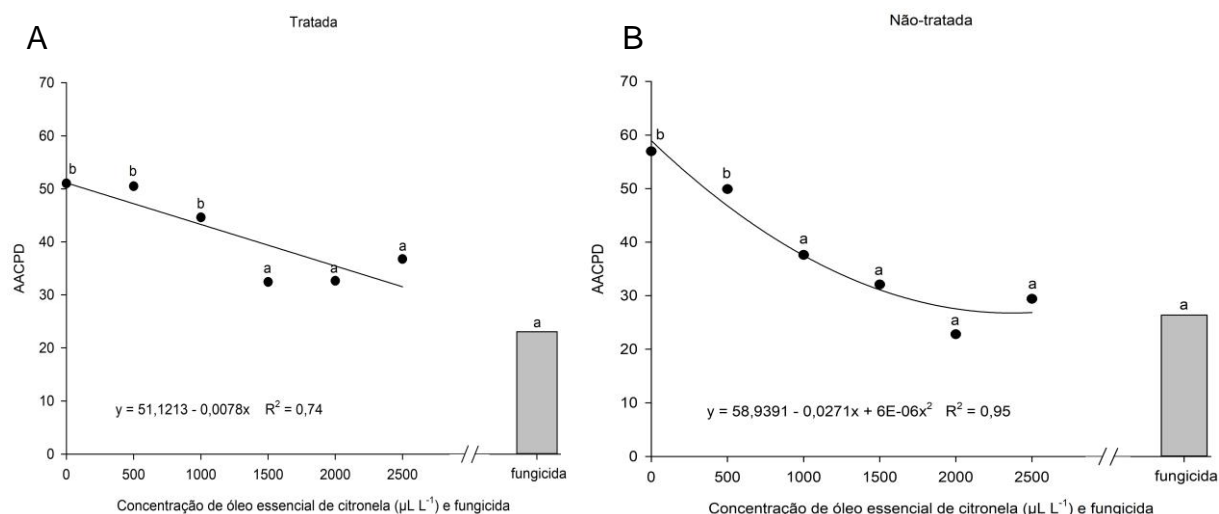


Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tomateiro tratadas (A) e não tratadas (B) com óleo essencial de citronela e fungicida, e inoculadas com *Alternaria solani*. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

A concentração de $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela reduziu 38,14% a AACPD para as folhas de tomateiro tratadas, seguido da concentração $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ com 30,52% de redução, $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ com 22,89%, $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ com 15,26% e a concentração de $500 \mu\text{L L}^{-1}$ reduziu a AACPD em 7,63% em comparação à concentração $0 \mu\text{L L}^{-1}$. Diante dos dados, o óleo essencial de citronela apresentou proteção local para a *A. solani*. As concentrações a partir de $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ não apresentaram diferença significativa com o fungicida.

Para as folhas de tomateiro não-tratadas a concentração mais eficaz do experimento foi de $2500 \mu\text{L L}^{-1}$ com redução de 51,32% da AACPD em comparação à concentração de $0 \mu\text{L L}^{-1}$ seguida da concentração $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ com 51,24% de redução, $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ com 46,06%, $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ com redução de 35,80% e $500 \mu\text{L L}^{-1}$ com 20,44% de redução. Essa redução da doença nas folhas não tratadas se deve ao potencial de indução de resistência do óleo essencial de citronela, o qual aumentou a atividade de enzimas de defesa. As concentrações a partir de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ não se diferiram do tratamento com fungicida, demonstrando-se assim o potencial antifúngico do óleo.

As folhas que receberam ou não o tratamento padrão de fungicida apresentaram resultados semelhantes para a AACPD, uma vez que a azoxistrobina, princípio ativo do composto, possui translocação mesostêmica. Essa característica possibilita uma compatibilidade do produto com a superfície foliar, podendo ser absorvido pela camada de cera (SILVA JÚNIOR; BEHLAU, 2018). Esta semelhança também pode ser derivada da ação do fungicida como indutor de resistência.

Pereira et al. (2011) afirmam que o controle parcial de *Cercospora coffeicola*, agente causal da cercosporiose em cafeeiro, tratado com uma concentração correspondente a 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela, é decorrente da presença de compostos como geraniol e citronelal.

Lucas (2012), avaliando óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro, observou uma porcentagem de controle da *A. solani* equivalente a 59% com a aplicação de óleo de citronela antes da inoculação do patógeno. O óleo essencial de capim-limão, também pertencente ao gênero *Cymbopogon*, apresentou 81% de controle do patógeno. Para ambos os óleos, foi utilizada uma concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$.

O óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) com concentração de 5000 $\mu\text{L L}^{-1}$ reduziu 25,62% a AACPD da podridão mole em plantas de alface (SILVA et al., 2012). Em cafeeiro, o óleo essencial de citronela (*C. nardus*) na concentração 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou uma redução de 43,08% da AACPD de cercosporiose (PEREIRA et al., 2011). Estes resultados comprovam a eficiência dos óleos do gênero *Cymbopogon* no controle de doenças.

A atividade enzimática de peroxidase apresentou incremento para o segundo e terceiro pares de folhas de tomateiro, com o tratamento de óleo essencial de citronela com a concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$, conforme a Figura 5.

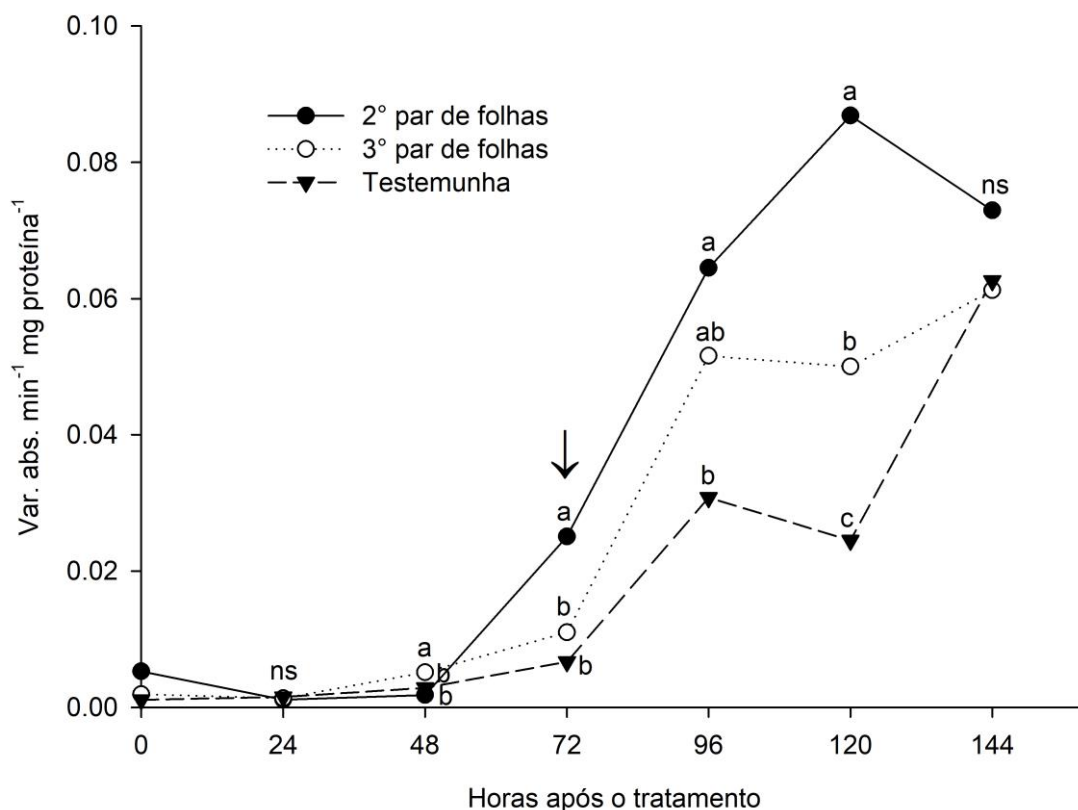


Figura 5 - Atividade de peroxidase em tomateiro. O tratamento com $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Uma tendência de incremento para o segundo par de folhas iniciou às 48 horas após o tratamento e com a inoculação do patógeno (72 horas) a atividade apresentou aumento. No decorrer das avaliações esse incremento se concretizou para o segundo e terceiro pares de folhas, diferente da testemunha, demonstrando que o incremento não foi somente pelo patógeno, mas também por um efeito indutor que ocorreu devido ao tratamento com o óleo.

A peroxidase é uma proteína de membrana envolvida na síntese de lignina na parede celular que, juntamente com a celulose, atua como uma barreira física na penetração fúngica. Além disso, a peroxidase opera no processo de defesa das plantas, reforçando a parede celular a partir da formação de lignina, apresentando ação antimicrobiana e também como sinalizadora (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980).

Resultados semelhantes foram encontrados por Itako (2008). O autor observou aumento na atividade de peroxidase nas folhas tratadas e não tratadas no patossistema tomate – pinta preta quando utilizado o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) como agente indutor. A aplicação preventiva do óleo essencial de capim-limão apresentou aumento local e sistêmico nas folhas do tomateiro, de acordo com o presente estudo.

A indução de resistência em tomateiro também foi constatada por Cavalcanti et al. (2006), sendo que indução por acibenzolar-S-metil (ASM) contra o patógeno *Xanthomonas vesicatoria* provocou aumento da atividade enzimática de peroxidase. Silva et al. (2004) também verificaram o incremento na atividade desta enzima induzido por *Bacillus cereus* nos patossistemas tomate - *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphyllium solani* e *X. vesicatoria*.

Para a atividade de polifenoloxidase no 2º e 3º pares de folhas, houve supressão em 24 horas após o tratamento com óleo essencial de citronela, sendo que em 48 horas essa supressão permaneceu apenas para o 2º par de folhas. Porém, a partir de 72 horas, coincidindo com o momento da inoculação do patógeno, ocorreu incremento na atividade de polifenoloxidase para o 2º e 3º pares de folhas, diferindo da testemunha (Figura 6). O incremento da atividade enzimática somente após a inoculação do patógeno é benéfica para as plantas, uma vez que não haverá gasto de energético sem necessidade (KUHN; PASCHOLATI, 2010).

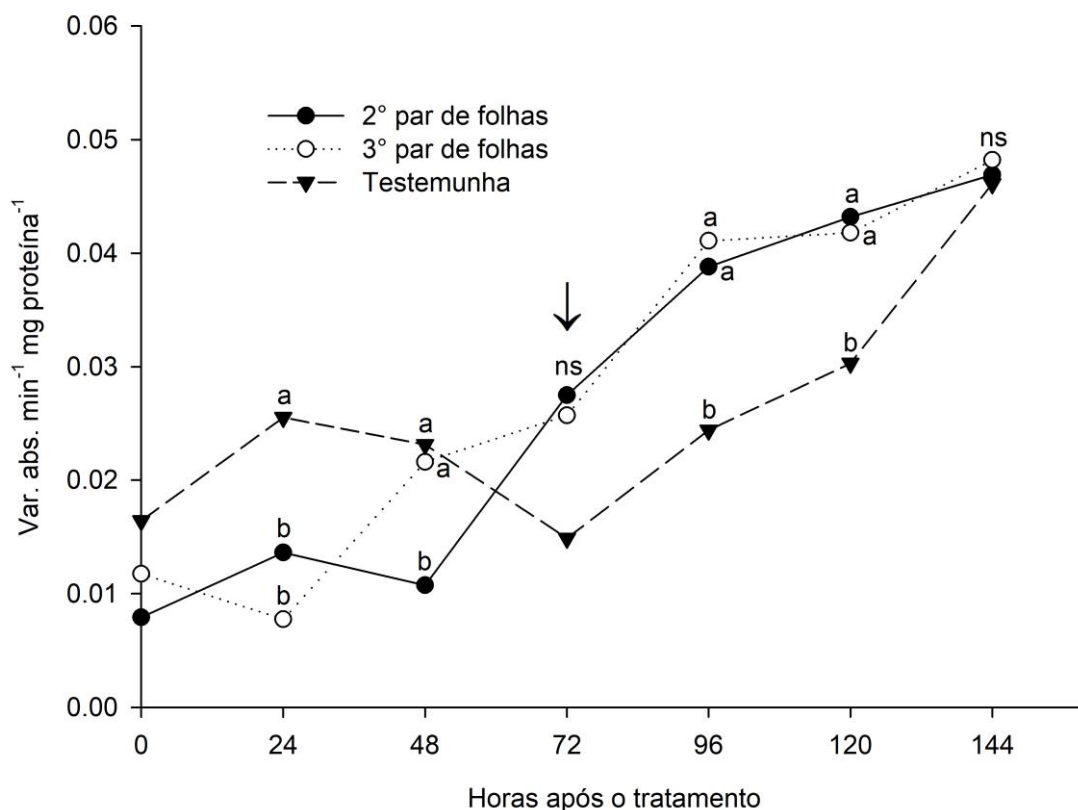


Figura 6 - Atividade de polifenoloxidase em tomateiro. O tratamento com 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A ruptura de uma célula, ocasionada pela ação de insetos ou patógenos libera as polifenoloxidases que iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos, originando quinonas tóxicas, as quais apresentam ação antimicrobiana (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Silva, Pascholati e Bedendo (2007) observaram um pico da atividade da enzima polifenoloxidase em plantas de tomate tratadas com os indutores extratos aquosos de cogumelos e acibenzolar-S-metil e inoculadas com a *Ralstonia solanacearum* após 72 horas do tratamento. De acordo com Portz et al. (2011), uma elevada atividade enzimática é ocasionada na colonização do patógeno, devido aos mecanismos de defesa que são ativados de modo mais acentuado na pós inoculação.

Ramamoorthy, Raguchander e Samiyappan (2002) também constataram incremento na atividade da polifenoloxidase em plantas de tomate depois do tratamento de sementes com isolados de *Pseudomonas fluorescens* e inoculadas com agente causador de tombamento (*Pythium aphanidermatum*).

Conforme o presente estudo, em Itako (2008) também se observou aumento local (folhas tratadas) e sistêmico (folhas não tratadas) da atividade enzimática, caracterizado pela enzima polifenoloxidase em tomateiro, induzidas por óleo essencial de *C. citratus* (capim limão) com a inoculação de *A. solani* três dias após o tratamento.

Na Figura 7 é apresentada a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) para o segundo e terceiro pares de folhas de tomateiro tratado com 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela e testemunha. A partir da inoculação, o segundo e terceiro pares de folhas de tomateiro apresentaram maior atividade da FAL em comparação à testemunha.

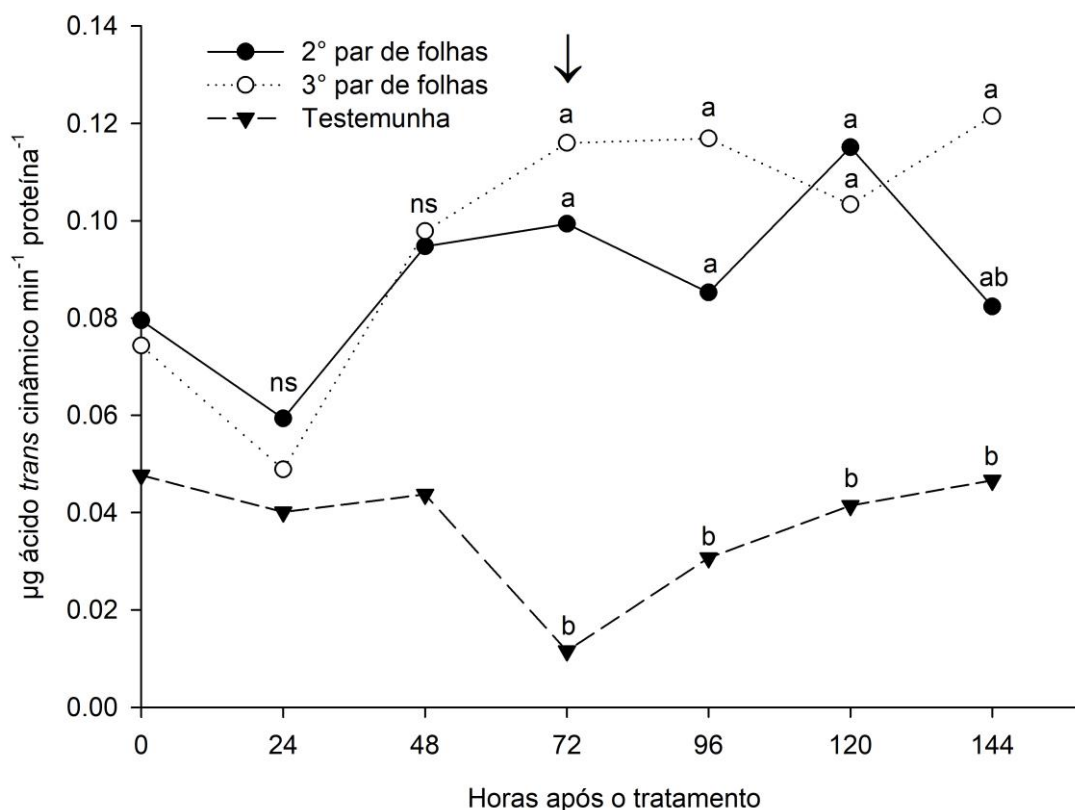


Figura 7 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em tomateiro. O tratamento com $2000 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de citronela foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A FAL atua na catalização da amônia da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico, sendo o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores. Esse ácido atua como precursor de numerosos compostos fenilpropanóides que realizam várias funções na planta, dentre elas a proteção para as plantas proporcionada pela síntese de lignina (RITTER; SCHULZ, 2004).

Ramamoorthy, Raguchander e Samiyappan (2002) observaram resultados semelhantes ao presente estudo ao avaliarem a indução de resistência de plantas de tomate, em que sementes foram tratadas com *P. fluorescens* e desafiadas com e sem o patógeno causador de tombamento em plantas (*P. aphanidermatum*). Os autores relataram que a atividade da FAL manteve-se em níveis elevados durante

todo o período experimental e para a testemunha a atividade da FAL diminuiu após o quarto dia de avaliação.

A atividade da FAL foi verificada por Silva (2013) com óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, pertencente ao mesmo gênero da citronela, em plantas de feijoeiro com e sem inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum*. Conforme o presente estudo, os autores também observaram elevada atividade da FAL em todos os períodos de avaliação, podendo significar que a rota dos fenilpropanóides sofreu alteração, e também a potencialização de mecanismos como a síntese de lignina.

3.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de citronela apresentou atividade antifúngica na *A. solani* e controle da pinta preta no tomateiro, o que pode ter ocorrido tanto por efeito fungitóxico direto sobre o patógeno quanto por indução de resistência local e sistêmica mediada pelas enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 66.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUM, R. B. C. S. **Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Tocantins, Gurupi, 2012.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R. M. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2006.

CRUZ, T. P. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre *Fusarium solani* e *Meloidogyne enterolobii***. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2013.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIALHO, R. O.; PAPA, M. F. S. Atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais sobre *Sphaceloma ampelinum*. **Cultura Agrônômica**, v. 24, n. 1, p. 63-70, 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e na comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

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

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agrônômica Ceres, 2016, p. 697-735.

ITAKO, A. T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 107-114, 2010.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 619-627, 2011.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, p. 491-498, 2002.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RESENDE, M. L. V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 115-123, 2011.

PORTZ, R. L.; FLEISCHMANN, F.; KOEHL, J.; FROMM, J.; ERNST, D.; PASCHOLATI, S. F.; OSSWALD, W. F. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. **Forest Pathology**, v. 41, p. 202-211, 2011.

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**, v. 108, p. 429-441, 2002.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, v. 16, p. 3426-3436, 2004.

SANTOS, G. R.; BRUM, R. B. C. S.; CASTRO, H. G.; GONÇALVES, C. G.; FIDELIS, R. R. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a helmintosporiose do capim Tanzânia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 587-593, 2013.

SILVA JÚNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 239-260.

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

SILVA, C. L.; SOUZA, E. B.; FELIX, K. C. S.; SANTOS, A. M. G.; SILVA, M. V.; MARIANO, R. L. R. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 632-638, 2012.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEERD, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA, J. L. **Óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro.** 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SILVA, R. F., PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.** Badajoz: Formatex Research Center, 2011, p. 1033-1042.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I. F.; LIBERATO, J. R. Quant: a software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch New Zealand: Plant Pathology Society, 2003. p. 105.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P. A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas: hortaliças.** Viçosa: UFV, 2000, p. 699-756.

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

4 ARTIGO III - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CONTROLE DA PINTA PRETA DO TOMATEIRO POR ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA

RESUMO: A principal doença foliar do tomateiro é a pinta preta que causa elevadas perdas de produtividade, e como consequência é uma das hortaliças que mais utiliza agrotóxicos. Uma opção ao uso de agrotóxicos é a utilização de óleos essenciais que podem atuar na defesa contra fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a ativação de enzimas de defesa no tomateiro tratado com óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*). Discos miceliais de *Alternaria solani* foram dispostos em placas de Petri com 0, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além de um tratamento adicional com fungicida (azoxistrobina + difenoconazol), sendo avaliado o crescimento micelial e a esporulação. Plantas de tomate foram cultivadas em casa de vegetação e aplicados os tratamentos no segundo par de folhas (folhas tratadas) e após 72 horas, inoculado o patógeno no segundo e terceiro pares de folhas (folhas não tratadas). A severidade foi expressa através da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase foi avaliada com a concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$. O crescimento micelial apresentou decréscimo linear conforme o aumento das concentrações, porém, a esporulação foi favorecida nessas condições. Nas folhas tratadas, a concentração 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou a maior redução da AACPD, correspondente a 53,32%, sendo que nas folhas não tratadas a concentração mais eficaz foi 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ com inibição de 42,30%. Foi observado incremento da peroxidase e fenilalanina amônia-liase no segundo e terceiro pares de folhas do tomateiro. O óleo essencial de melaleuca pode ser uma alternativa no controle da pinta preta do tomateiro, o que pode ocorrer por atividade antimicrobiana direta e indução de resistência local e sistêmica.

Palavras-chave: Controle alternativo. Indução de resistência. *Melaleuca alternifolia*. *Alternaria solani*.

ARTICLE III - ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CONTROL OF THE EARLY BLIGHT OF TOMATO BY ESSENTIAL OIL OF TEA TREE

ABSTRACT: The main foliar disease of the tomato is the early blight that causes high losses of productivity, and, consequently, is one of the vegetables that most uses pesticides. An option to agrochemicals is the use of essential oils that can act in defense against phytopathogens. The objective was to evaluate the antifungal activity and the control of the early blight of tomato treated with essential oil of tea tree (*Melaleuca alternifolia*). Mycelial disks of the *Alternaria solani* were added in Petri dishes, with 0, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ of essential oil and a standard treatment with fungicide (azoxystrobin + diphenconazole). Mycelial growth and sporulation were evaluated. Tomato plants were cultivated under greenhouse and the treatments were applied to the second pair of leaves (treated leaves) and after 72 hours the pathogen was inoculated in the second and third pairs of leaves (untreated leaves). The severity was expressed through the area under the disease progress curve (AUDPC). The activity of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase were evaluated with the concentration of 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$. Mycelial growth showed a linear decrease as the concentrations increased, but sporulation was favored under these conditions. In the treated leaves, the concentration 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ presented the highest reduction of AUDPC, corresponding to 53.32%, and in the untreated leaves the most effective concentration was 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ with inhibition of 42.30%. An increase of the peroxidase and phenylalanine ammonia lyase in the second and third leaves of the tomato was observed. The essential oil of tea tree can be an alternative in the control of the early blight of tomato, both by fungitoxic activity and local and systemical resistance induction.

Key words: Alternative control. Resistance induction. *Melaleuca alternifolia*. *Alternaria solani*.

4.1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das espécies de hortaliças que apresenta maior ocorrência de doenças, provocando grandes perdas na produtividade. Dentre as doenças, destaca-se a pinta preta, também conhecida por mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria solani*, que provoca elevada destruição foliar e danos nos frutos (INOUE-NAGATA et al., 2016).

A tomaticultura utiliza elevada quantidade de agrotóxicos e uma alternativa é a utilização de substâncias derivadas de plantas, como os extratos vegetais e óleos essenciais, pois não apresentam agressão ao meio ambiente, não expõem os alimentos à contaminação dos agrotóxicos e reduzem o risco de intoxicação humana daqueles que tem contato com os produtos químicos, além de reduzir a seleção de fitopatógenos resistentes e erradicação de microrganismos benéficos do solo (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

A diversidade na composição dos óleos essenciais proporciona capacidade no controle de fitopatógenos, devido a sua ação fungitóxica direta e através da indução de resistência, sendo consideradas fontes de compostos biologicamente ativos em diversos patossistemas (STANGARLIN et al., 2011a).

A indução de resistência ativa mecanismos de defesa vegetal contra pragas e doenças através da utilização de produtos bióticos ou abióticos. Dentre os mecanismos de defesa podem-se citar as enzimas peroxidase que estão diretamente ligadas à lignificação celular, polifenoloxidase que transforma fenóis em quinonas tóxicas aos microrganismos, e fenilalanina amônia-liase, envolvida na rota de síntese dos fenilpropanóides (STANGARLIN et al., 2011b).

A melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), também conhecido por *tea tree*, é uma árvore aromática nativa da Austrália, com grande interesse econômico devido à presença de óleo armazenado no tecido foliar (ABREU, 2006). Seu óleo possui ação antisséptica, germicida e antifúngica devido a seus constituintes como α -terpineno, p-cimeno, 1,8-cineol e terpineno-4-ol, entre outros (TESKE; TRENTINI, 1997).

O potencial do óleo essencial de melaleuca tem sido verificado em diversos patossistemas como *Stemphylium* spp. em cebola (SOUZA et al., 2015), *Botrytis cinerea* em morangueiro (LORENZETTI et al., 2011), *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e *Alternaria alternata* em tomateiro (MARTINS et al., 2010).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica, o controle da pinta preta e a ativação de enzimas de defesa vegetal no tomateiro tratado com óleo essencial de melaleuca.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento do patógeno *Alternaria solani* foi realizado pelo método indireto, em que fragmentos de frutos de tomate com sintomas da doença foram cortados e depositados em placa de Petri com meio de cultura e mantidos a 25 °C e escuro em câmara do tipo BOD. O isolado foi preservado pelo método de Castelani e tubo de ensaio com meio de cultura suco V8-ágar.

O óleo essencial de melaleuca (*M. alternifolia*) foi obtido em farmácia de manipulação e o fungicida adotado como tratamento padrão era composto pelo princípio ativo azoxistrobina + difenoconazol. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com sete tratamentos, sendo: 0; 500; 1000; 1500; 2000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial, além de um tratamento adicional com fungicida, com cinco repetições cada.

A atividade antifúngica sobre o patógeno foi avaliada por meio do crescimento micelial e esporulação, em vista disto, o meio de cultura utilizado foi o suco V8-ágar, o qual foi preparado e autoclavado. Os tratamentos foram adicionados ao meio de cultura ainda fundente, com adição de detergente Tween 20 na proporção 1:1 (v/v) para a homogeneização da solução. A concentração de fungicida foi utilizada conforme a recomendação do fabricante, correspondendo a 40 mL 100 L^{-1} de água.

Após a solidificação do meio de cultura em cada placa de Petri (90 mm de diâmetro), foi depositado no centro das mesmas um disco micelial de 6 mm da colônia com 14 dias de idade. Em seguida, as mesmas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara do tipo BOD a 25 °C e escuro.

O crescimento micelial foi avaliado por medições diárias do diâmetro das colônias (mm), em dois eixos perpendiculares entre si, iniciando 24 horas após a instalação do experimento e calculado no momento em que um tratamento atingiu toda a superfície da placa de Petri. Para o cálculo da relação entre o crescimento micelial e os dias de avaliação as medições foram estendidas até o momento em que todas as colônias cobriram toda a superfície do meio de cultura ou não apresentaram evolução do crescimento no decorrer dos dias.

Ao finalizar a avaliação de crescimento micelial foi analisada a esporulação do fungo. Para isso, foram adicionados 10 mL de água deionizada em cada placa de Petri e após a raspagem da colônia com auxílio de uma lâmina de vidro, a suspensão foi filtrada em gaze, sendo determinado o número de esporos por mL em

câmara de Neubauer. A esporulação foi calculada com base na área micelial de cada tratamento.

O experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação localizada em Toledo (PR), com delineamento experimental de blocos casualizados, sendo adotados os mesmos tratamentos citados anteriormente e quatro repetições.

A adubação do solo foi realizada de acordo com a análise química do mesmo e necessidade da cultura do tomateiro. As sementes de tomate Caqui, cultivar Odete, foram semeadas em bandeja de poliestireno expandido de 200 células contendo substrato comercial. As mudas foram transplantadas aos 30 dias após a semeadura para cultivo em solo e suplementadas com fertirrigação.

Após 30 dias do transplântio das mudas, o segundo par de folhas na parte inferior da planta foi tratado com o fungicida e o óleo essencial de melaleuca nas concentrações de acordo com cada tratamento. Para obter uma mistura homogênea entre o óleo essencial e a água foi utilizado Tween 20 na proporção 1:1 (v/v).

Após 72 horas da aplicação dos tratamentos, o segundo par de folhas (tratadas) e o terceiro par de folhas inferiores (não tratadas), foram inoculados com *A. solani*. A suspensão de esporos foi preparada com adição de 10 mL de água deionizada em placa de Petri contendo o patógeno com 30 dias de crescimento em meio de cultura suco V8-ágar. A suspensão foi ajustada para 1×10^4 esporos mL⁻¹. Os esporos foram inoculados nas folhas de tomateiro com auxílio de borrifador, até o ponto de escorrimento e, em sequência, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 12 horas com auxílio de saco plástico.

A severidade da pinta preta em tomateiro foi avaliada com intervalo de dois dias, tendo início no sétimo dia após a inoculação do fungo. As folhas do tomateiro tratadas e não-tratadas foram fotografadas e analisadas no software Quant (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2003), sendo calculada a severidade da doença. A área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD) foi calculada pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977), com base na severidade média da doença por planta, o número de avaliações e o intervalo entre duas aplicações, por meio da fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=0}^n \left(\frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$$

Onde, n = número de observações; Y_i = severidade da doença na “ i ”-ésima observação; X_i = tempo em dias na “ i ”-ésima observação.

Mudas de tomates foram cultivadas conforme experimento anterior para avaliação da atividade enzimática, sendo utilizada a concentração de $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca. Após 30 dias do transplante das mudas, foram coletados discos de 1 cm de diâmetro do tecido vegetal nas folhas tratadas (2º par de folhas) e nas não tratadas (3º par de folhas), no intervalo de 0 h (momento do tratamento), 24 h, 48 h, 72 h (momento da inoculação), 96 h, 120 h e 144 h após os tratamentos. As coletas também foram realizadas em plantas de testemunha que foram somente inoculadas com o patógeno. Cada amostra coletada foi acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise bioquímica.

Os discos foliares foram homogeneizados mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), em almofariz de porcelana. O homogenato foi centrifugado a $20000g$ durante 25 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático.

As enzimas analisadas foram peroxidase (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUC, 1982); polifenoxidase (DUANGMAL; APENTEN, 1999) e fenilalanina amônia-liase (UMESHA, 2006). O teor de proteínas foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos foram realizados os demais testes. As concentrações de óleo essencial foram submetidas à análise de regressão com 5% de probabilidade de erro e os dados referentes às enzimas foram analisados pelo teste de Tukey a 5%, ambos com o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). O fungicida foi comparado com os demais tratamentos pelo teste de Dunnett, adotando-se nível de 5% de probabilidade de erro, por meio do software estatístico Genes (CRUZ, 2006).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial do patógeno *A. solani* apresentou efeito dose-dependente para as concentrações de óleo essencial de melaleuca, ao nível de 5% de probabilidade de erro. O efeito linear decrescente demonstra que a concentração

de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ correspondeu a 55,89% de inibição do crescimento do micélio, conforme a Figura 1.

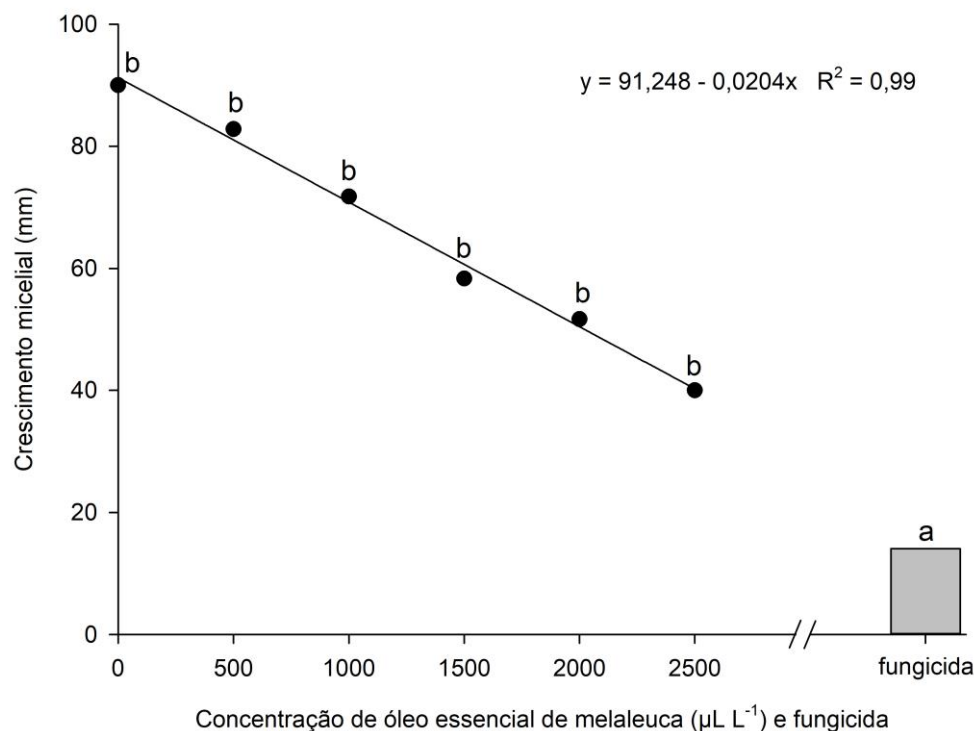


Figura 1 - Crescimento micelial (mm) do fungo *Alternaria solani* em presença de concentrações de óleo essencial de melaleuca ($\mu\text{L L}^{-1}$) e fungicida, no 10º dia de avaliação. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

A concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou inibição de 44,71% do crescimento micelial do patógeno em estudo, seguida da concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ com 33,53%, 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ com 22,36% e a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ inibiu 11,18% do crescimento micelial da *A. solani* em comparação a concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$. A efetividade do óleo essencial de melaleuca na redução do micélio de *A. solani* também foi observada por Abreu (2006). O fungicida, por sua vez, apresentou 84,58% de redução, sobressaindo-se estatisticamente dos demais tratamentos pelo teste de Dunnett.

O óleo essencial de melaleuca apresentou efeito antifúngico sobre *A. solani* do tomateiro, podendo ser explicado pela sensibilidade do fungo quando em contato com as substâncias do óleo. Conforme Silva et al. (2003), o óleo essencial de melaleuca apresenta elevada concentração de terpineno-4-ol, sendo um dos componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana de diversos patógenos.

Pela análise de regressão, o crescimento micelial do patógeno poderia ser inibido em 100% com uma concentração equivalente a 4473 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca. Essa informação é condizente com o estudo de Martins et al. (2010), em que os autores observaram a total inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata* com a concentração de 4000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca.

O óleo de melaleuca nas concentrações de 1000, 2500, 5000 e 10000 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi avaliado na atividade antifúngica de fungos patogênicos originados em leguminosas por Marinelli et al. (2012). Os autores constataram que a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou total inibição apenas para o fungo *Peyronellaea pinodella*, já para os patógenos *Peyronellaea pinodes*, *Phomopsis longicolla*, *Ascochyta lentis* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram observados 100% de inibição a partir da concentração de 5000 $\mu\text{L L}^{-1}$. Sendo assim, o óleo essencial de melaleuca apresenta potencial antimicrobiano, porém, a concentração inibitória varia de acordo com o patógeno.

O crescimento micelial da *A. solani* está exposto na Figura 2, em que o aumento das concentrações de óleo essencial de melaleuca retardou em aproximadamente um dia o crescimento micelial do patógeno. O micélio com concentração 0 $\mu\text{L L}^{-1}$ cobriu toda a superfície da placa no 10º dia de condução do experimento, enquanto que para a concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ o micélio teve seu total crescimento no 11º dia, a concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ no 12º dia, 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ no 14º dia, 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (15º dia) e a concentração mais alta correspondente a 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou total crescimento no 16º dia de avaliação. O fungicida promoveu crescimento micelial até o 6º dia, não sendo constatada alteração após esta avaliação.

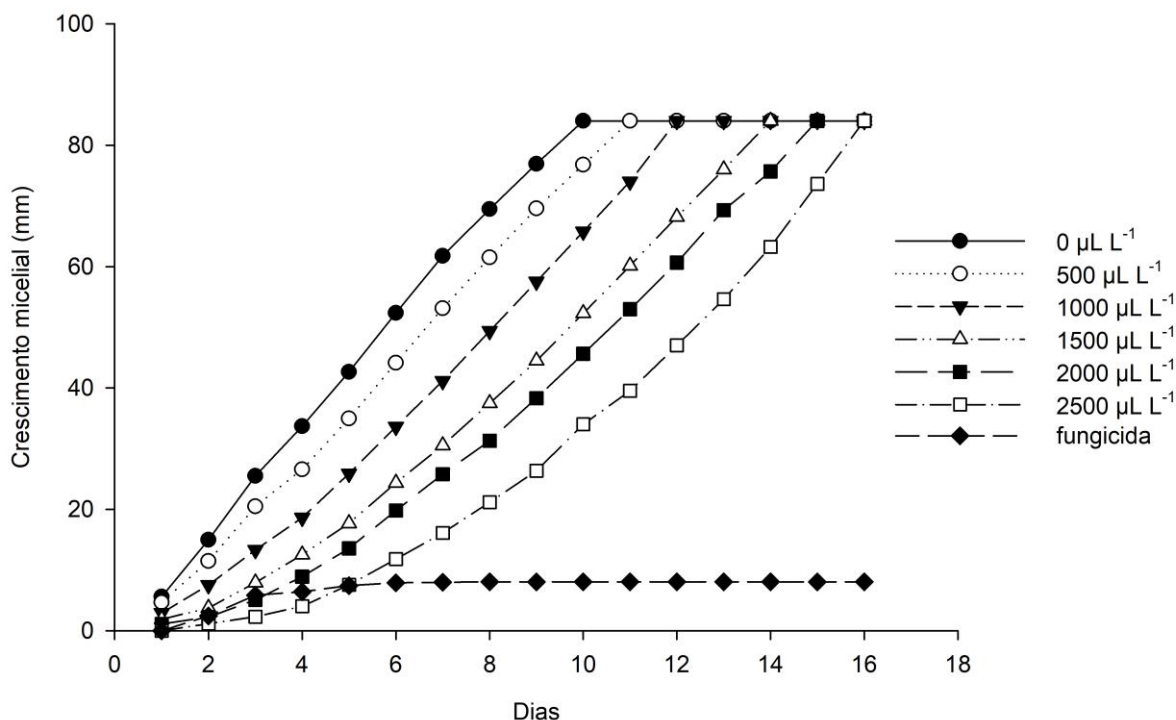


Figura 2 - Crescimento micelial (mm) de *Alternaria solani* de acordo com os dias de avaliação, submetido a dosagens de óleo essencial de melaleuca ($\mu\text{L L}^{-1}$) e fungicida.

O retardamento do crescimento micelial do patógeno pode estar ligado às substâncias disponíveis em cada tratamento. Sugere-se que sucessivas aplicações do óleo em tomateiro para as concentrações mais elevadas podem reduzir o desenvolvimento micelial do patógeno, que por sua vez reduz a área foliar danificada, favorecendo a efetividade do óleo essencial de melaleuca na atividade antifúngica.

O óleo essencial de melaleuca nas concentrações de 125 e 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ utilizado na atividade antifúngica de *Botrytis cinerea* em morangueiro foi avaliado por Lorenzetti et al. (2011). Os autores constataram que a concentração de 125 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou 10% de redução do índice de crescimento micelial do patógeno em comparação à testemunha, enquanto que a concentração 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou 48% de inibição, demonstrando assim, que o óleo essencial de melaleuca pode ser eficiente na redução da atividade antifúngica de patógenos, conforme o aumento da concentração.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Souza et al. (2015), sendo observada redução significativa do índice de velocidade de

crescimento micelial da queima-de-estenfílio em cebola, causada por *Stemphylium* spp., em função das concentrações de 2000, 4000, 6000 e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca, apresentando-se como um potencial antifúngico.

A esporulação do patógeno, avaliada ao término do crescimento micelial, foi calculada com base na área do micélio de cada tratamento. O aumento da concentração de óleo essencial de melaleuca promoveu o aumento da esporulação do patógeno em estudo. A concentração de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou acréscimo de 30,18% de esporulação de *A. solani*. As concentrações de 1000 e 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ tiveram 50,29% de acréscimo e as concentrações de 1500 e 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram acréscimo de 60,35% da esporulação do patógeno (Figura 3).

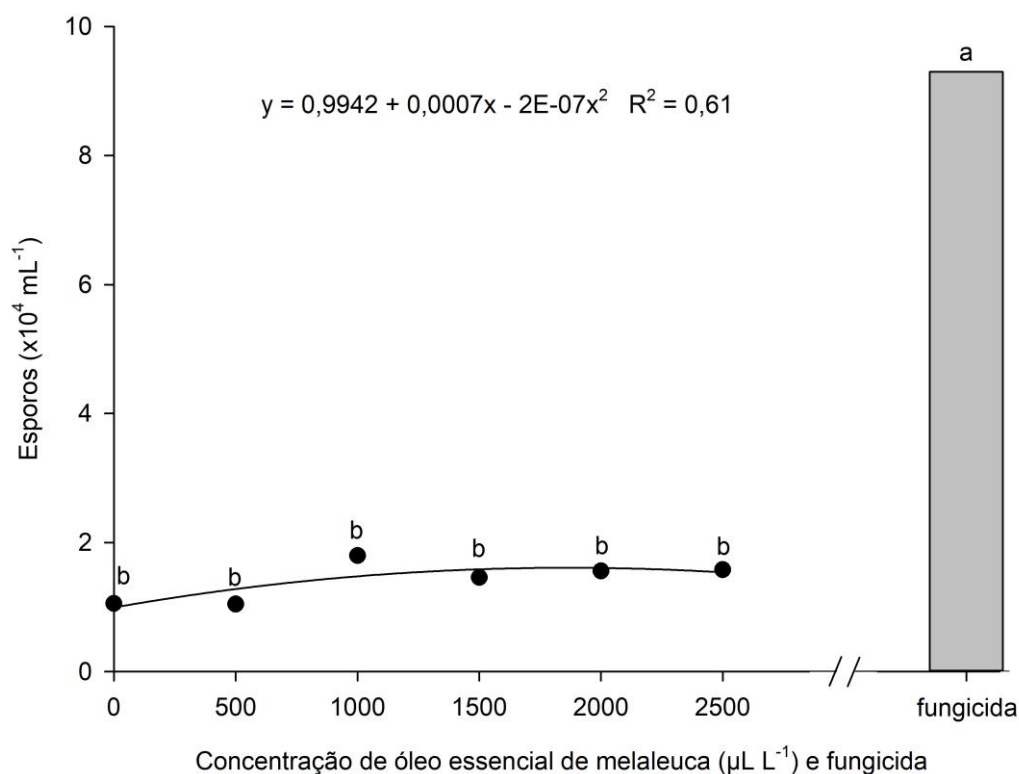


Figura 3 - Esporulação do fungo *Alternaria solani* submetido a dosagens de óleo essencial de melaleuca e fungicida. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

Conforme Amorim e Pascholati (2018) a produção de estruturas reprodutivas de um patógeno é afetada diretamente por condições do ambiente em que o mesmo está exposto. Os fatores nutrição, temperatura, luz e condições de estresse podem induzir esporulação fúngica (RODRIGUES et al., 2010), logo as substâncias do óleo

essencial de melaleuca podem ter estimulado a produção das estruturas reprodutivas do patógeno.

Outro fator que pode ter estimulado a formação de esporos é o estresse sofrido pelo patógeno, quando teve seu crescimento micelial reduzido devido ao aumento das concentrações de óleo essencial de melaleuca. Como medida de sobrevivência, o fungo *A. solani* passou a produzir maior quantidade de estruturas reprodutivas, aumentando assim sua capacidade de reprodução e disseminação.

Resultados semelhantes foram observados por Lorenzetti et al. (2011), ao constatar que a concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca promoveu incremento de 54,51% da esporulação de *Botrytis cinerea*, isolado de morango. O incremento de esporos também foi observado pelos autores com o óleo essencial de lavanda e alecrim.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) apresentou efeito quadrático tanto para as folhas tratadas (2º par de folhas) com óleo essencial de melaleuca quanto para as folhas não tratadas (3º par de folhas), conforme pode ser observado na Figura 4.

As folhas tratadas (Figura 4A) com óleo essencial e inoculadas com o patógeno apresentaram menor AACPD quando submetidas à concentração de 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ que apresentou inibição correspondente a 53,32% em comparação a concentração 0 $\mu\text{L L}^{-1}$, seguida da concentração de 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ com 49,62%, ambas semelhantes ao fungicida (59,42% de inibição) pelo teste de Dunnett, demonstrando o potencial antifúngico do óleo.

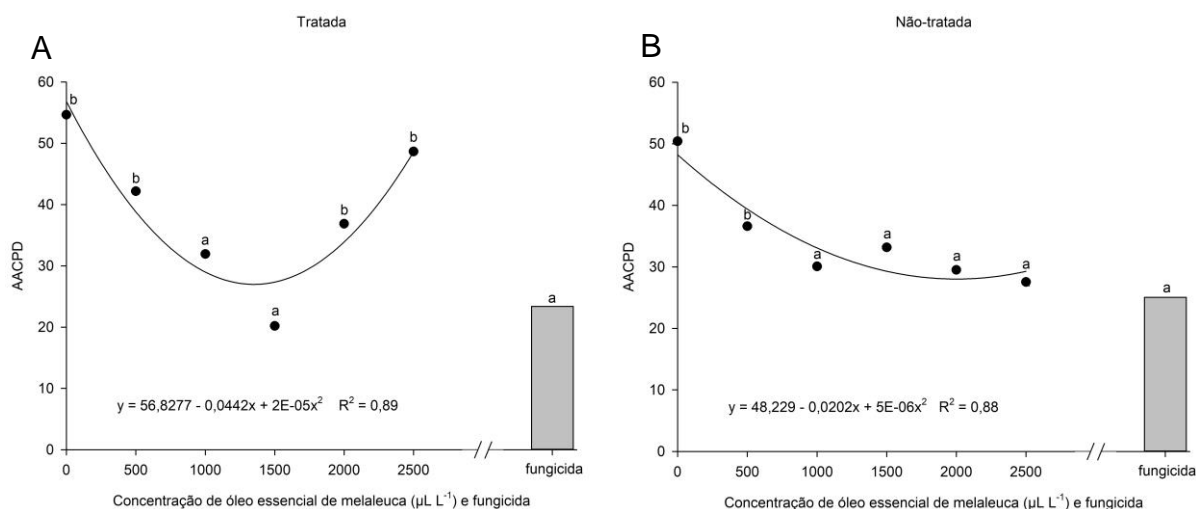


Figura 4 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tomateiro tratada (A) e não tratada (B) com óleo essencial de melaleuca e fungicida, e inoculadas com *Alternaria solani*. Nota: letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Dunnett.

Nas folhas não tratadas (Figura 4B) a concentração mais eficaz do experimento foi de 2000 µL L⁻¹ com inibição de 42,30%, seguida da concentração de 2500 µL L⁻¹ com 39,91%, 1500 µL L⁻¹ com 39,52% e 1000 µL L⁻¹ com redução de 31,52%, sendo todas essas concentrações semelhantes ao fungicida pelo teste de Dunnett, demonstrando assim tanto o efeito local quanto sistêmico do óleo essencial de melaleuca para controle da pinta preta do tomateiro.

A semelhança da AACPD entre as folhas que receberam ou não o tratamento padrão de fungicida pode ser derivada da translocação mesostêmica do princípio ativo azoxistrobina. Essa característica confere uma afinidade com a superfície foliar do tomateiro, podendo ser absorvido pela camada de cera (SILVA JÚNIOR; BEHLAU, 2018). Outro fator que pode ter originado esta semelhança é a possibilidade do fungicida ter agido como indutor de resistência.

O controle de doença com óleo essencial de melaleuca também foi avaliado por Pereira et al. (2011), sendo observada redução de 20,36% da área abaixo da curva de progresso da doença em cafeeiro, inoculado com *Cercospora coffeicola*, agente causal da cercosporiose, utilizando uma concentração de 1000 µL L⁻¹.

Souza et al. (2015) avaliaram a porcentagem de infecção de *Cercospora beticola* em folhas de beterraba, após 90 dias de aplicação de diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca. Os autores observaram decréscimo da infecção ao aumentar as concentrações, sendo detectada uma redução da

infecção de 35,6%, 21% e 19,4% com as respectivas concentrações de 1600 $\mu\text{L L}^{-1}$; 6700 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 8000 $\mu\text{L L}^{-1}$.

A atividade enzimática de peroxidase no 2º e 3º pares de folhas sofreu alterações conforme o tratamento com 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial e inoculação do patógeno *A. solani*. Ambos os pares de folhas apresentaram atividade superior à testemunha com exceção da avaliação no tempo de 96 horas (Figura 5).

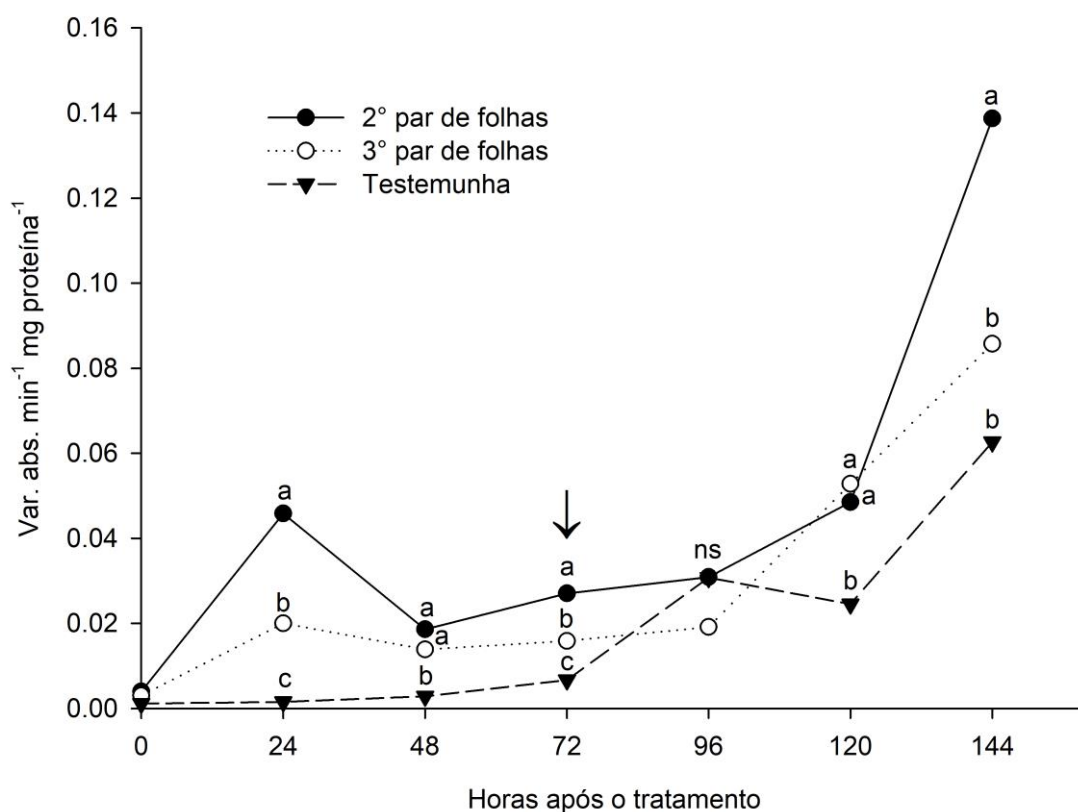


Figura 5 - Atividade de peroxidase em tomateiro. O tratamento com 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Um pico na atividade da peroxidase ocorreu em 24 horas após o tratamento, podendo estar relacionado com o próprio efeito indutor do óleo essencial de melaleuca, pois não havendo a inoculação verifica-se que a atividade voltou a reduzir.

A peroxidase vem sendo muito estudada devido a sua participação e importância na indução de resistência atuando no processo de defesa das plantas.

Em muitos casos o incremento da sua atividade está diretamente ligado com a redução da severidade da doença (ITAKO, 2008).

Conforme Stangarlin et al. (2011b), a lignina da parede celular é alterada pela atividade da enzima peroxidase, através da oxidação de álcoois fenólicos, que atuam preventivamente. Dessa forma, a ação de um indutor de resistência pode dificultar a penetração do patógeno na parede celular, promovendo maior resistência contra toxinas liberadas pelos patógenos.

Os compostos antimicrobianos que atuam sobre o patógeno são formados a partir de proteínas antioxidantes, como a peroxidase, ativando assim a defesa vegetal. Por sua vez, o sistema enzimático das plantas desempenha um papel fundamental na defesa vegetal contra microrganismos patogênicos (GULSEN et al., 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cavalcanti et al. (2006) com plantas de tomateiro tratadas com acibenzolar-S-metil e uma formulação natural de biomassa cítrica, e inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria*. Os autores observaram um pico da atividade enzimática de peroxidase em 24 horas após o tratamento com ambos os indutores, havendo um incremento acentuado da atividade após 48 horas da inoculação.

Na Figura 6 são apresentadas as atividades de polifenoloxidase para o segundo e terceiro pares de folhas de tomateiro e testemunha. A atividade enzimática não apresentou incremento no 2º e 3º pares de folhas em comparação à testemunha nas amostragens nos tempos de 24, 48 e 72 horas após o tratamento com o óleo essencial, não se diferindo entre si.

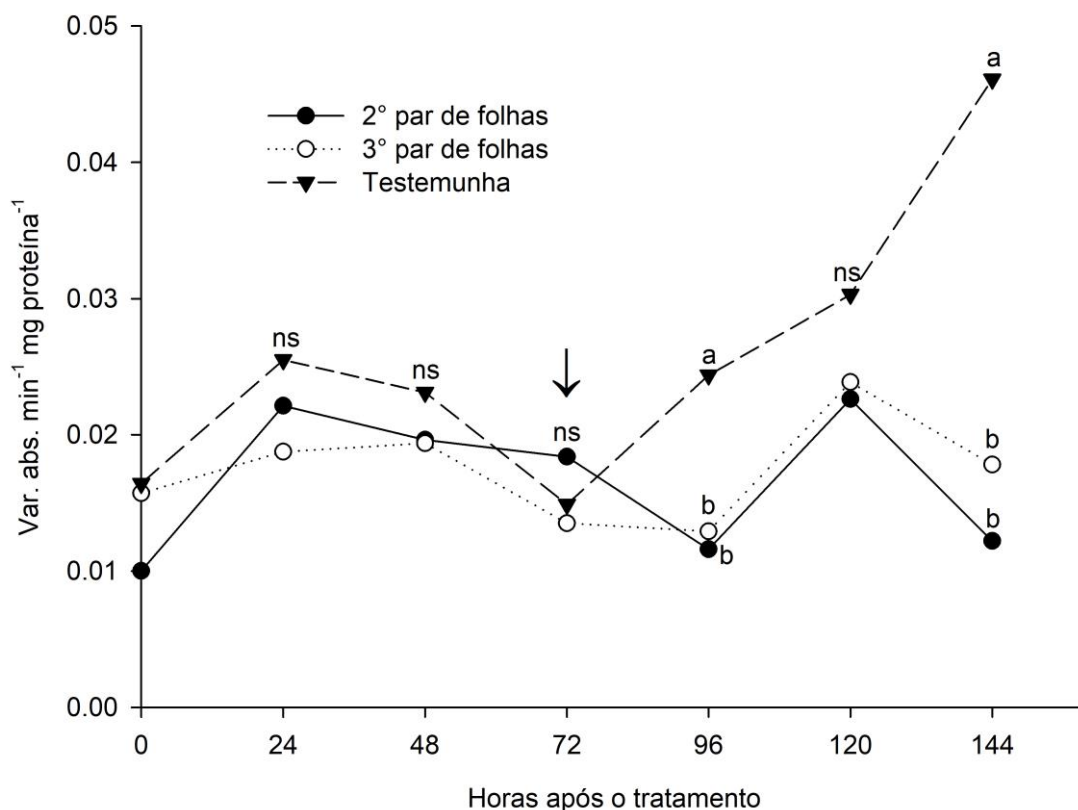


Figura 6 - Atividade de polifenoloxidase em tomateiro. O tratamento com $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

A elevação da atividade da polifenoloxidase foi observada apenas na testemunha quando ocorreu a inoculação do patógeno, apresentando sua máxima atividade em 144 horas. Provavelmente não haja relação do óleo essencial de melaleuca com a ativação ou indução da atividade de polifenoloxidase, uma vez que o 2º e 3º pares de folhas apresentaram atividade inferior à testemunha.

O controle da atividade enzimática de polifenoloxidase pode ser feito por métodos físicos e químicos, este último envolve a utilização de compostos antioxidantes que inibem a ação dessa enzima (OLIVEIRA et al., 2008). O óleo essencial de melaleuca pode ter atuado como um composto antioxidante nas folhas de tomateiro, uma vez que a elevação da atividade dessa enzima foi observada apenas nas folhas testemunha.

A polifenoloxidase possui importante atividade na resistência a doenças, porque conforme Campos et al. (2004), esta enzima possui propriedades capazes de oxidar compostos fenólicos em quinonas, tendo ação protetora no local do ferimento. Diante disto, essa enzima contribui para a formação de barreira química de defesa, agindo diretamente sobre os patógenos.

Uma enzima pode sofrer incremento ou redução em sua atividade dependendo da cultura e do tratamento. Becker (2005), por exemplo, observou baixa atividade enzimática de peroxidase ao trabalhar com oídio em soja tratado com extratos do gênero *Citrus*. O autor também constatou redução da severidade da doença, indicando que podem haver outros mecanismos de defesa ou atividade antimicrobiana direta que estejam envolvidos no controle da doença, assemelhando-se ao presente estudo, em que a atividade de uma enzima não sofreu incremento, porém, apresentou controle da doença, devido a ativação de outras enzimas de defesa vegetal.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) pode ser observada na Figura 7, onde houve incremento para o 2º e 3º pares de folhas de tomateiro com a inoculação do patógeno, diferenciando-se da testemunha nas amostragens com 72, 96 e 120 horas.

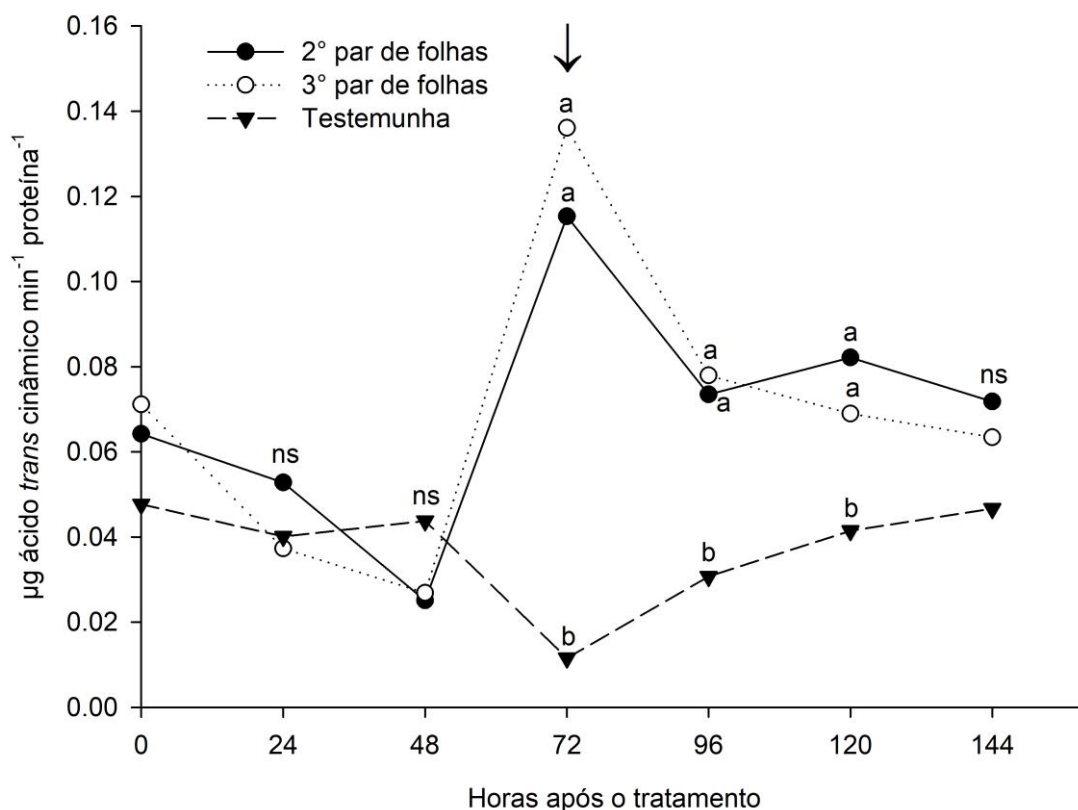


Figura 7 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em tomateiro. O tratamento com $1500 \mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de melaleuca foi realizado no 2º par de folhas 72 horas antes da inoculação de *Alternaria solani*, que ocorreu no 2º e 3º pares de folhas. A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação com *Alternaria solani*, 72 horas após o tratamento. Nota: letras diferentes em cada tempo diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Incremento da atividade da FAL no 2º e 3º pares de folhas foi observado a partir de 48 horas após o tratamento com o óleo essencial de melaleuca, apresentando um elevado pico com a chegada do patógeno. Posteriormente ocorreu redução da atividade, porém, ainda assim, manteve-se maior em relação à testemunha para as amostragens com 96 e 120 horas.

A fenilalanina amônia-liase é a enzima chave no processo de produção de compostos fenólicos relacionadas à defesa das plantas. A FAL catalisa a formação do ácido *trans*-cinâmico, originando o primeiro produto na rota dos fenilpropanóides, que por sua vez, participa de diversas reações, como a síntese de lignina (conferindo proteção às plantas), flavonóides (antocianinas), fitoalexinas e o ácido salicílico (STANGARLIN et al., 2011b).

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2007) ao avaliarem a indução de resistência em tomateiro por extratos de cogumelos e acibenzolar-S-metil inoculados com *Clavibacter michiganensis*, causador da doença cancro bacteriano, observando um aumento da FAL em todos os tratamentos indutores.

Por fim, vale ressaltar que existem poucos relatos na literatura que abordam a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase induzidas por óleo essencial de melaleuca, independente do patossistema.

4.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de melaleuca proporcionou atividade antifúngica sobre *A. solani* e controle da pinta preta do tomateiro, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência local e sistêmica pela ativação das enzimas de defesa peroxidase e fenilalanina amônia-liase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais.** 2006. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2006.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 66.
- BECKER, A. **Controle de doenças de final de ciclo e oídio da soja por extratos aquosos de *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Curcuma longa* e solução de curcumina.** 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMPOS, A. D., FERREIRA, A. G; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R. M.; Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 372-380, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística Experimental e Matrizes**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2006.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE, F.; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turfgrasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 4, p. 45-55, 2010.

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

INOUE-NAGATA, A. K.; LOPES, C. A.; REIS, A.; PEREIRA, R. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; PINHEIRO, J. B.; LIMA, M. F. Doenças do Tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016, p. 697-735.

ITAKO, A. T. **Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: atividade antifúngica em *Alternaria solani* e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO JR, R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 619-627, 2011.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015.

MARINELLI, E.; ORZALI, L.; LOTTI, E.; RICCIONI, L. Activity of some essential oils against pathogenic seed borne fungi on legumes. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 6, n. 3, p. 66-74, 2012.

MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungo fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.

OLIVEIRA, T. M., SOARES, N. F. F., PAULA, C. D., VIANA, G. A. Uso da embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RESENDE, M. L. V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 115-123, 2011.

RODRIGUES, T. T. M. S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 4, p. 203-212, 2010.

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

SILVA JÚNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 239-260.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, A. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2003.

SILVA, R. F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

SOUZA, A. D.; ROGGIERO, T. U.; FURLAN, M. R.; AOYAMA, E. M. Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1078-1082, 2015.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz: Formatex Research Center, 2011a, p. 1033-1042.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011b.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium - Compêndio de Fitoterapia**. 3 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I. F.; LIBERATO, J. R. Quant: a software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch. **Proceedings...** Christchurch New Zealand: Plant Pathology Society, 2003. p. 105.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho evidenciam que os óleos essenciais de bergamota, citronela e melaleuca são promissores no controle da pinta preta do tomateiro, o que pode ocorrer por atividade antifúngica sobre o patógeno e também por indução de resistência local e sistêmica com envolvimento de enzimas de defesa do tomateiro, estimulando novas pesquisas e aprofundamento do controle desse patossistema.

Os óleos essenciais apresentaram ação antifúngica direta sobre *A. solani*. A concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ do óleo essencial de bergamota reduziu em 68,15% o crescimento micelial do patógeno. A total inibição foi observada com a mesma dosagem com o óleo de citronela, e o óleo essencial de melaleuca apresentou 55,89% de redução do crescimento.

A produção de estruturas reprodutivas do patógeno sofreu decréscimo conforme o aumento das concentrações de óleo essencial de bergamota, apresentando uma inibição correspondente a 29,48% com a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$. Com a mesma concentração do óleo essencial de citronela não houve esporulação do patógeno. Já com o óleo essencial de melaleuca, a produção de esporos apresentou incremento com o aumento das concentrações.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi reduzida com o aumento das concentrações de óleo essencial de bergamota, sendo que a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou redução de 21,59% nas folhas tratadas e 53,69% nas folhas não tratadas.

O óleo essencial de citronela apresentou redução da AACPD em 38,14% nas folhas de tomateiro tratadas e 51,32% nas folhas não tratadas, ambas com a concentração de 2500 $\mu\text{L L}^{-1}$, assemelhando-se ao fungicida.

As folhas de tomateiro tratadas com óleo essencial de melaleuca apresentaram redução de 53,32% com a concentração 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$ em comparação à concentração de 0 $\mu\text{L L}^{-1}$. As folhas não tratadas apresentaram a maior redução da AACPD com a concentração de 2000 $\mu\text{L L}^{-1}$, com redução de 42,30%.

Incremento da atividade enzimática foi observado no tomateiro, sendo a atividade de peroxidase e polifenoloxidase afetadas com os óleos de bergamota, citronela e melaleuca, nas concentrações de 2500, 2000 e 1500 $\mu\text{L L}^{-1}$,

respectivamente. A atividade de polifenoloxidase apresentou incremento apenas para os tratamentos com os óleos de bergamota e citronela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- CAMARGO, R. F. **Tratamentos alternativos na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de espécies florestais**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, Elsevier, v. 12, p. 961-973, 1973.
- CARVALHO, C. R. F.; PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; SOUZA, C. L. M.; SOUSA, E. F. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, p. 12, p. 2293-2299, 2014.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: UFLA, 2003.
- _____. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e na comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.
- IURKIV, C. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.
- LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MACHADO, R. M. A.; MUSSI-DIAS, V.; SOUZA, C. L. M.; SILVA, L. B.; FREIRE, M. G. M. Avaliação de óleos essenciais sobre o crescimento *in vitro* do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Perspectivas Online: biologia e saúde**, v. 8, n. 4, p. 64-75, 2013.
- MARTINS, J. A. S.; SAGATA, E.; SANTOS, V. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial *in vitro* de fungo fitopatogênicos. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.
- MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 175-190, 1992.
- PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 423-452.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 378-385, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Orgs.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 227-248.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011a.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.) **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz: Formatex Research Center, 2011b, p. 1033-1042.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.