Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Nível Mestrado

MARÍA ISABEL BALBI-PEÑA

EFEITO DO EXTRATO DO RIZOMA DE *Curcuma longa* E SOLUÇÃO DE CURCUMINA EM *Alternaria solani* E CONTROLE DE PINTA PRETA EM TOMATEIRO

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
FEVEREIRO/2005

MARÍA ISABEL BALBI-PEÑA

EFEITO DO EXTRATO DO RIZOMA DE *Curcuma longa* E SOLUÇÃO DE CURCUMINA EM *Alternaria solani* E CONTROLE DE PINTA PRETA EM TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
FEVEREIRO/2005

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Renato Stangarlin, pela atenção e orientação no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Mário César Lopes, pelas sugestões e colaboração na condução do ensaio realizado no Núcleo de Estações Experimentais da Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon.

À minha família, pela paciência e apoio constantes.

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

À amiga Andrea Becker, pela sua ajuda incondicional.

A Gilmar Franzener pela sua colaboração no trabalho de laboratório.

Aos demais professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram no desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **v**
LISTA DE FIGURAS ..... **vi**
RESUMO ..... **vii**
ABSTRACT ..... **ix**
1 INTRODUÇÃO **1**
2 REVISÃO DE LITERATURA **3**
2.1 O PATOSSISTEMA TOMATE - *Alternaria solani* **3**
2.1.1 Importância da Cultura do Tomate no Brasil 3
2.1.2 A Doença Pinta Preta 4
2.1.3 Problemas Derivados do Controle Químico 6
2.2 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS **7**
2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA **7**
2.3.1 Características da Resistência Induzida 9
2.3.2 Sinais Para a Indução de Resistência Sistêmica a Patógenos 10
2.4 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS COM EXTRATOS VEGETAIS **12**
2.5 A CÚRCUMA E SEU USO PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS **14**
3 MATERIAL E MÉTODOS **17**
3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DO PATÓGENO DESAFIADOR **17**
3.2 ENSAIOS *IN VITRO* PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA **17**
3.2.1 Teste de Inibição do Crescimento Micelial 18
3.2.2 Teste de Inibição da Esporulação 20
3.2.3 Esterilização por Filtração 20
3.2.4 Teste de Inibição da Germinação de Esporos 21
3.2.5 Curva de Germinação de Esporos 23
3.3 ENSAIOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE CONTROLE DE PINTA PRETA E DETERMINAÇÃO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *A. solani*. **23**
3.3.1 Produção de Mudas e Implantação dos Ensaios 24
3.3.2 Montagem dos Ensaios e Avaliações 25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **30**

4.1 CURVA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS **30**
4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* **31**
4.2.1 Extrato de Cúrcuma 31
4.2.2 Soluções de Curcumina 33
4.3 ENSAIOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE CONTROLE DE PINTA PRETA E DETERMINAÇÃO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *A. solani*. **36**
4.3.1 Ensaio 1 36
4.3.2 Ensaio 2 40
5 CONCLUSÕES **43**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **44**
APÊNDICE **49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos testes de crescimento micelial e inibição de esporulação *in vitro* de *A. solani.*. 19

Tabela 2. Tratamentos utilizados no teste de inibição da germinação de esporos *in vitro* de *A. solani*. 22

Tabela 3. Tratamentos utilizados no ensaio *in vivo* 1 25

Tabela 4. Tratamentos utilizados no ensaio *in vivo* 2. 28

Tabela 5. Efeito do extrato bruto autoclavado de *C. longa* sobre a esporulação *in vitro* de *A. solani.*..... 31

Tabela 6. Efeito do extrato bruto de *C. longa* esterilizado por filtração sobre o crescimento micelial (CM) e a esporulação *in vitro* de *A. solani.* 32

Tabela 7. Efeito do extrato bruto de *C. longa* não autoclavado sobre a germinação de esporos *in vitro* de *A. solani*..... 33

Tabela 8. Efeito de curcumina sobre o crescimento micelial (CM*) in vitro* de *A. solani.* 34

Tabela 9. Severidade de pinta preta em folhas de tomateiro tratadas com diferentes produtos..... 36

Tabela 10. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta em tomateiro e porcentagem de redução de área foliar (AF) causada pela doença em função de diferentes tratamentos em plantas mantidas em cultivo protegido. 37

Tabela 11. Produção comercial de tomateiro mantido em cultivo protegido e porcentagem de frutos comerciais (frutos pequenos, médios e grandes) em plantas inoculadas com *A. solani* e tratadas com diferentes produtos..... 39

Tabela 12. Número de lesões de pinta preta nas 7ª e 8ª folhas de tomateiro cultivado em vaso aos 56 dias após o transplante. 41

Tabela 13. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta nas 7ª e 8ª folhas de tomateiro cultivado em vaso. 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta (a) e rizoma (b) de cúrcuma (*C. longa*). 18

Figura 2. Escala diagramática adaptada de Boff (1988) para avaliação de severidade de pinta preta em folíolo de tomateiro. 26

Figura 3. Curva de germinação *in vitro* de esporos de *A. solani*. 30

Figura 4. Ajuste da reta de inibição de crescimento micelial *in vitro* de *A. solani* em função da concentração de curcumina 35

RESUMO

A pinta preta, causada por *Alternaria solani*, é uma das mais importantes doenças da cultura do tomateiro no Brasil. A doença ocorre em folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos. Várias alternativas aos fungicidas têm sido avaliadas nos últimos anos na busca de produtos que controlem satisfatoriamente as doenças, tenham pequeno impacto ambiental e baixa toxicidade aos seres vivos. A descoberta de muitos compostos secundários de plantas com atividade antimicrobiana e/ou indutores de resistência, mostra-se promissora. A cúrcuma, *Curcuma longa*, apresenta compostos em seus rizomas com comprovada atividade antimicrobiana. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade fungitóxica *in vitro* dos extratos brutos de cúrcuma e da curcumina contra *A. solani* e determinar o potencial dos mesmos no controle da pinta preta em tomateiro. Foram utilizados extratos brutos aquosos de rizomas de cúrcuma (esterilizados por autoclavagem) nas concentrações de 1, 5, 10 e 20% e curcumina nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg L^{-1}, os quais foram incorporados em meio de cultura batata-dextrose-ágar para avaliação de crescimento micelial e esporulação do fungo. Para avaliar o efeito da autoclavagem, foram testados extratos de cúrcuma a 10 e 15% esterilizados por filtração. Foi testado também o efeito dos extratos de cúrcuma autoclavados e não autoclavados e da curcumina na germinação de esporos *in vitro*. Os extratos de cúrcuma a 10 e 15% sem autoclavar, inibiram em 38,2% e 23,2% respectivamente o crescimento micelial e 71,7% e 87%, respectivamente, a esporulação do fungo. Quando autoclavados, não apresentaram inibição do crescimento micelial nem da germinação de esporos e a inibição da esporulação foi menor, indicando a presença de compostos antimicrobianos termolábeis. O extrato não autoclavado na concentração de 5%, inibiu um máximo de 15% a germinação dos esporos. A curcumina inibiu o crescimento micelial em 29,5% na maior concentração. Não foi verificado efeito da curcumina sobre a esporulação e a germinação de esporos *in vitro*. No ensaio *in vivo*, conduzido em casa de vegetação, foi avaliada a severidade da doença e a produção e classificação de frutos. Os tratamentos utilizados foram: extrato de cúrcuma (1 e 10%), curcumina (50 e 100 mg L^{-1}), acibenzolar-S-metil (ASM) (2,5 g 100 L^{-1} de i.a.),

oxicloreto de cobre (110 g L^{-1} de i.a.), azoxystrobin (40 g L^{-1} de i.a.) e testemunha (água). A curcumina e os extratos brutos de cúrcuma apresentaram níveis de controle de pinta preta, no campo, similares ao tratamento com fungicida cúprico, mas inferior ao azoxystrobin. Não houve diferenças estatísticas na produção comercial de frutos entre tratamentos. Somente o tratamento de curcumina 50 mg L^{-1} apresentou maior porcentagem de frutos grandes em relação à testemunha. Outro ensaio foi conduzido com o objetivo de verificar a indução de resistência em plantas cultivadas em vasos. Aos 26 dias após o transplante, a 7ª folha da planta recebeu extrato de cúrcuma (1 e 10%), curcumina (50 e 100 mg L^{-1}), ASM (2,5 g 100 L^{-1} de i.a.) ou água, por aspersão. Após 72 h, a 7ª folha tratada e a 8ª folha (não tratada) foram inoculadas com *A. solani*. Na 7ª folha, os tratamentos com extrato de cúrcuma 10% e curcumina 100 mg L^{-1} apresentaram um valor de área abaixo da curva de progresso da doença estatisticamente menor à testemunha, o que poderia indicar indução de resistência local ou atividade antimicrobiana direta. Na 8ª folha, somente o extrato de cúrcuma 10% apresentou diferença significativa com a testemunha o que poderia indicar uma indução de resistência sistêmica pelo extrato bruto de cúrcuma. Esses resultados indicam o potencial de cúrcuma e curcumina para o controle de pinta preta no tomateiro.

.

ABSTRACT

Early blight, caused by *Alternaria solani*, is one of the most important diseases of tomato in Brazil. This disease affects leaves, stems, petioles and fruits causing important economical losses. New alternatives to fungicides have been evaluated to control the diseases with low environmental impact and low toxicity to living beings. The discovery of vegetal secondary compounds with antimicrobiotic activity or secondary compounds that induce disease resistance shows to be very promissory. Turmeric, *Curcuma longa*, has compounds in its rhizomes with proved antimicrobiotic activity. The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* fungitoxic activity of turmeric extracts and curcumin against *A. solani* and to determinate their potential in the control of tomato early blight. Four different concentrations (1, 5, 10 and 20%) of aqueous extracts of turmeric rhizomes (sterilized by autoclavation) and four curcumin solutions (50, 100, 200 and 400 mg L^{-1}) were incorporated into potato dextrose agar medium in order to evaluate fungal micelial growth and esporulation. To evaluate the effect of autoclavation, 10% and 15% turmeric extracts were sterilized by filtration. The effects of autoclavated and non autoclavated turmeric extracts and curcumin on *in vitro* spore germination were tested. The concentrations of 10 and 15% non autoclavated turmeric extracts inhibited the micelial growth by 38,2% and 23,2%, respectively, and the fungal sporulation by 71,7% and 87% respectively. When the turmeric extracts were autoclavated, neither micelial growth nor spore germination was inhibited and the effect on the sporulation was reduced, suggesting the presence of thermolabile antimicrobiotic compounds. The non autoclavated 5% extract inhibited by 15% the spore germination. At the highest concentration, the curcumin solution inhibited the micelial growth by 29,5%. Neither *in vitro* esporulation nor spore germination was affected by curcumin. At a greenhouse experiment, desease severity, fruit production and classification were evaluated. The treatments were: 1 and 10% turmeric extracts, 50 e 100 mg L^{-1} curcumin solutions, acibenzolar-S-metil (ASM) (2,5 g 100 L^{-1} of a.i.), copper oxychloride (110 g L^{-1} of a.i.), azoxystrobin (40 g L^{-1} of a.i.) and control (water). The disease control showed by turmeric extracts and curcumin solutions was similar to cuprous fungicide, but inferior to azoxystrobin control. There was no statistical difference in comercial fruit production between treatments. Only 50 mg L^{-1} curcumin treatment had higher porcentage of bigger fruits

compared to the control. Another experiment with tomato plants growing in vases was performed with the subject of veryfing resistance induction. After 26 days of transplanting, the 7$^{th.}$ leaf was sprayed with turmeric extract (1 and 10%), curcumin (50 e 100 mg L^{-1}), ASM (2,5 g a.i. 100 L^{-1}) and water. Seventy two hours later, 7$^{th.}$ treated leaf and 8$^{th.}$ untreated leaf were inoculated with *A. solani*. At 7$^{th.}$ leaf, 10% turmeric extract and 100 mg L^{-1} curcumin treatments showed an statistically inferior area under disease progress curve, compared to the control, what could suggest induction of local resistance or direct antimicrobiotic activity. At 8$^{th.}$ leaf, only 10% turmeric extract shows significant difference compared with the control, what could mean a systemic resistance induced by turmeric extract. These results show the potential of turmeric and curcumin in the control in tomato early blight.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o uso de produtos químicos é a medida de controle de doenças mais utilizada na agricultura. Apesar de seu uso racional ter benefícios a curto prazo para o produtor, apresenta problemas a longo prazo, derivados da seleção de isolados resistentes às substâncias químicas utilizadas e da poluição causada pelos resíduos dessas substâncias.

O controle alternativo agrupa outras medidas de proteção das plantas contra as doenças, como o controle biológico e a indução de resistência em plantas. A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agentes externos, sem qualquer alteração do genoma da planta. Isto ocorre de maneira não-específica, através de ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa tais como: proteínas relacionadas à patogênese (como quitinases e glucanases); enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas; e acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do patógeno, entre outros. Os agentes de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de defesa nas plantas, são chamados de indutores, cujos eliciadores são de variada natureza química.

A indústria de defensivos já tem desenvolvido moléculas capazes de proteger uma cultura contra os patógenos causadores de doenças apenas pela indução dos mecanismos de defesa da planta. Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado o

potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de eliciadores. Dentre estas plantas está a *Curcuma longa*, uma zingiberaceae originária do sudeste asiático.

A pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani*, é uma das principais doenças que atacam folhas e frutos em tomateiro. Atualmente, o pequeno número de cultivares com resistência genética, asociado ao alto custo de suas sementes, determina medidas de controle baseadas exclusivamente em produtos químicos para as cultivares tradicionalmente cultivadas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método alternativo de controle de pinta preta com o tratamento com extrato de rizoma de cúrcuma e com a substância purificada curcumina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PATOSSISTEMA TOMATE - *Alternaria solani*

2.1.1 Importância da Cultura do Tomate no Brasil

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é a segunda solanácea mais cultivada no mundo, sendo apenas superada pela cultura da batata. O Brasil é o maior produtor desta hortaliça na América Latina e o nono produtor a nível mundial. A produção média anual de tomate no Brasil no período 1996-2001 foi de 2,907 milhões de toneladas em uma área cultivada de 62.817 ha, com produtividade média de 46,75 t ha^{-1} (Camargo Filho & Mazzei, 2002). Segundo esses autores, o estado de Goiás é o maior produtor (23,6 % do total do país) onde predomina o tomate para indústria, seguido por São Paulo (21,3%) e Minas Gerais (20,9%) onde principalmente a produção atende ao consumo *in natura*.

O cultivo do tomateiro exige alto nível tecnológico e intensa utilização de mão-de-obra. Apesar do elevado índice de mecanização nas operações de preparo de solo, adubação, transplante, irrigação e pulverização, são necessários cerca de 100 homens/dia/ha, na execução das tarefas de capinas e colheitas manuais, o que dá a essa cultura elevada importância econômica e social (EMBRAPA Hortaliças, 2003).

2.1.2 A Doença Pinta Preta

A pinta preta caracteriza-se por ser uma das mais importantes e freqüentes doenças da cultura do tomateiro, nas condições brasileiras de cultivo. A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos do tomateiro, ocasionando elevados prejuízos econômicos (Kurozawa & Pavan, 1997). As perdas são diretas através da infecção de frutos e indiretas através da redução do vigor da planta, além de danos aos frutos expostos aos raios do sol em decorrência da desfolha. A maior severidade da doença ocorre durante a fase de frutificação (Vale et al., 2000).

Etiologia

O agente causal da pinta preta, *Alternaria solani* (Ellis & Martin) L.R. Jones & Grout, foi descrito pela primeira vez em 1882. O fungo se caracteriza pela produção de conidióforos septados, subhialinos a escuros, com conídios produzidos terminalmente. Os conídios são tipicamente escuros, septados longitudinal e transversalmente, e clavados, com extremidade pontiaguda com ou sem bico. O fungo pertence ao grupo de fungos Mitospóricos, ordem Moniliales e Família Dematiaceae (Vale et al., 2000).

Sintomas

Esta doença afeta toda a parte aérea da planta, a partir das folhas mais velhas e próximas ao solo. A pinta preta normalmente não ataca folhas novas, o que a diferencia da mancha-de-estenfílio, da pinta bacteriana e da mancha bacteriana. Na folha, a doença caracteriza-se pela presença de manchas grandes, escuras, circulares, com anéis concêntricos. O ataque severo provoca desfolha acentuada e expõe o fruto à queima de sol. Também é comum o aparecimento de cancro no colo e nas hastes. Nesse caso, o sintoma é caracterizado por lesões grandes, com anéis concêntricos, semelhantes aos que ocorrem nas folhas. Nos frutos, verifica-se uma podridão deprimida, grande, circular, próxima ao pedúnculo, coberta por mofo preto na superfície (Lopes et al., 2000).

Se forem utilizadas sementes infectadas, pode ocorrer podridão de sementes e morte de plântulas em pré e pós-emergência. As mudas pequenas podem apresentar sintomas de necrose do colo, caracterizados pelo anelamento da base do caule, apresentando crescimento retardado e murchando até a morte (Vale et al., 2000).

Epidemiologia

A ocorrência de epidemias severas desta doença está associada a uma faixa de temperatura diária de 25 a 32 ºC e as temperatura mínimas, ótimas e máximas para germinação dos conídios estão em torno de 5, 27 e 32 ºC, respectivamente. A presença de água livre na superfície da folha é fundamental para

a germinação, infecção e esporulação do fungo. A esporulação abundante de *A. solani* ocorre na faixa de 14 a 26 ºC, com umidade relativa de 100% durante 24 horas. Sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, podem ocorrer vários ciclos secundários de duração relativamente curta durante o ciclo da cultura, levando ao surgimento de epidemias (Vale et al., 2000).

O fungo sobrevive nos restos culturais e infecta outras hortaliças como a batata e a berinjela, além de invasoras como o "juá-de-capote". A doença é transmitida também por sementes (EMBRAPA Hortaliças, 2003).

Segundo EMBRAPA Hortaliças (2003), atualmente não existem cultivares comerciais resistentes, devendo-se pulverizar preventivamente com os fungicidas registrados para essa doença. Recomenda-se também incorporar os restos culturais imediatamente após a última colheita e fazer rotação de cultura com gramíneas.

2.1.3 Problemas Derivados do Controle Químico

De acordo com os resultados do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do Instituto Biológico (IB) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, o tomate encontra-se entre as hortaliças com maior nível de resíduos de produtos fitosanitários.

Em trabalho que visou diagnosticar o uso de inseticidas, fungicidas, formicidas e herbicidas em 18 importantes culturas da agricultura paulista, verificou-se que o tomate representa uma das culturas mais problemáticas quanto ao uso de agrotóxicos, registrando-se elevado percentual de intoxicações em trabalhadores envolvidos com a aplicação de agrotóxicos nessa cultura (Vicente et al., 2002).

2.2 MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

A resistência do hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subseqüente atividade de um patógeno em seus tecidos (Pascholati & Leite, 1995). Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias: pré-formados (presentes na planta antes do contato com o patógeno) e pós-formados (produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno). Segundo Resende & Machado (2000) e Pascholati & Leite (1995), cada grupo de mecanismos compreende, por exemplo:

- Pré-formados (passivos, constitutivos):
  - estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;
  - bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídeos, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fototoxinas.
- Pós-formados (ativos; induzíveis):
  - estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses;
  - bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese.

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A resistência induzida em plantas envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência através de tratamentos com agentes bióticos (por exemplo, microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos (por exemplo, luz ultravioleta, metais pesados). A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subseqüente inoculação da planta com o

patógeno (tratamento desafiador), o que indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias são importantes neste fenômeno (Pascholati & Leite, 1995).

Dong et al. (2003) utilizaram micélio seco de *Penicillium chrysogenum* aplicado nas raízes de dois cultivares de *Gossypium hirsutum* e dois de *G. barbadense* para determinar sua eficácia no controle de *Verticillium dahliae* Kleb. A aplicação via solo determinou uma proteção significativa contra a murcha de Verticillium em todos os cultivares. Como *Penicillium chrysogenum* não apresentou inibição do crescimento micelial *de V. dahliae in vitro*, o controle foi atribuído à resistência induzida. O tratamento com *Penicillium chrysogenum* determinou uma atividade aumentada da peroxidase e da deposição de lignina nos hipocótilos de algodão.

Brown et al. (2001) avaliaram diferentes doses de luz ultravioleta–C (UV-C) em tratamento de sementes para eliciar resistência à podridão negra (causada *por Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) e melhorar o crescimento e a qualidade de repolhos. A dose de 3,6 kJm^{-2} foi efetiva em reduzir a podridão negra e a população de *X. campestris* pv. *campestris* em folhas infectadas de repolho. Sementes tratadas com essa dose de UV-C produziram plantas de melhor cor, maior peso e tamanho de cabeça e amadurecimento retardado do que plantas oriundas de sementes não tratadas.

Stevens et al. (1999) trataram raízes de batata-doce com uma dose baixa de UV-C, armazenaram-nas por trinta dias e, posteriormente, inocularam-nas com *Fusarium solani*. As raízes armazenadas após tratamento com UV-C mostraram aumento na resistência a podridão por Fusarium demonstrada por redução do diâmetro das lesões, da profundidade e do peso do tecido apodrecido. Constataram

que a exposição das raízes de batata-doce a doses de UV-C promoveram maior produção de fenilalanina-amônia-liase, uma enzima chave na síntese de compostos fenólicos. Também determinaram que extratos de raízes de batata-doce tratados com UV-C reduziram a germinação, a elongação do tubo germinativo e o crescimento de *F. solani* comparado com extratos obtidos de raízes não tratadas.

Silva (2002) avaliou a indução de resistência em tomateiro contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pelo uso de um composto químico indutor, o acibenzolar-S-metil (BION®), através da medida da atividade de peroxidase. As plantas tratadas com BION® apresentaram aumentos significativos na atividade dessa enzima a partir de 12 horas após o tratamento, sugerindo que a lignificação está possivelmente envolvida na resposta de defesa do tomateiro contra essa bactéria.

Resende at al. (2000) avaliaram o benzotiadiazole (BTH) (ou acibenzolar-S-metil) como indutor de resistência contra *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa no cacaueiro. O BTH reduziu a incidência da doença em plântulas e foi detectado um aumento significativo na atividade das peroxidases aos 3, 15 e 30 dias após pulverização das plântulas com o produto.

2.3.1 Características da Resistência Induzida

Quando uma planta sobrevive à infecção local de um patógeno, freqüentemente desenvolve maior resistência a ataques posteriores em outros locais da planta e adquire proteção contra um amplo espectro de patógenos. Este

fenômeno, chamado de Resistência Sistêmica Induzida (SAR), desenvolve-se após um período de vários dias desde a infecção inicial (Ryals et al., 1996).

A resistência induzida apresenta duas características fundamentais, segundo Pascholati & Leite (1995):

- sistemicidade: a resistência, após induzida, pode se expressar não só no sítio primário de inoculação mas também sistemicamente em tecidos distantes do local da primeira infecção;

- amplitude de efetividade: a ausência de especificidade da resistência induzida é refletida não somente pelos diferentes indutores possíveis de uso, mas também no amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida.

A proteção induzida em plantas envolve a ativação de mecanismos de resistência representados por barreiras bioquímicas e estruturais como, por exemplo: aumento na atividade da enzima oxidativa peroxidase, acúmulo de fitoalexinas, quitinases, β-1,3 glucanases, proteínas de resistência, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e lignificação dos tecidos.

2.3.2 Sinais Para a Indução de Resistência Sistêmica a Patógenos

A resistência da planta está correlacionada com a ativação de vários mecanismos de defesa. A resposta envolve ativação da transcrição de numerosos genes relacionados à defesa, abertura de canais de íons, modificações do *status* de fosforilação das proteínas e ativação de enzimas pré-formadas para realizar modificações nos metabolismos primário e secundário. Além disso, são geradas moléculas sinalizadoras para assegurar a coordenação da resposta de defesa tanto

temporalmente quanto espacialmente, resultando em rápida contenção do patógeno (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

O ácido salicílico (AS) e o ácido benzóico acumulam-se em grandes concentrações nas células vizinhas de sítios de infecção incompatíveis. Ambos são derivados da rota dos fenilpropanóides e têm várias funções nas respostas de defesa da planta. Existem muitas evidências sobre o envolvimento de AS na resistência sistêmica adquirida, mas parece não ocorrer de forma generalizada, uma vez que a ativação de genes de defesa pode ocorrer através de rotas independentes do AS. Para Hammond-Kosack & Jones (2000), um papel sinalizador do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é provável, pois induz a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidrolase, requerida para a biossíntese do AS.

O ácido jasmônico é um regulador vegetal relacionado à indução de resposta sistêmica (Cordeiro & Sá, 1999). O aumento da concentração do ácido jasmônico em resposta ao ataque de patógenos e insetos ocorre local e sistemicamente (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

O etileno é freqüentemente sintetizado durante interações compatíveis e incompatíveis, embora não seja necessário para várias respostas de resistência. O etileno é requerido para mediar a resistência contra fungos fitopatogênicos necrotróficos e contra fungos de solo que não são comumente fitopatógenos (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Existem outras moléculas como: proteína G, inositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol que estão envolvidas na transdução de sinais.

Segundo Walling (2001), dois tipos de resistência induzida estão bem caracterizados. Resistência sistêmica adquirida (SAR), que é dependente da sinalização mediada pelo ácido salicílico e é ativada pelo acibenzolar-S-metil (BTH; ASM; BION®). A resistência sistêmica induzida (ISR), a qual se desenvolve após

colonização de algumas rizobactérias, é dependente da ação seqüencial do ácido jasmônico e do etileno. A SAR está correlacionada com aumento nos níveis de AS e com a expressão de genes de proteínas relacionadas à patogênese. A ISR não está correlacionada com mudanças importantes em RNA ou nos padrões protéicos, sugerindo que a ISR produz compostos de defesa ainda não conhecidos que contribuem para a resistência.

2.4 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS COM EXTRATOS VEGETAIS

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto e óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos pela indução de mecanismos de defesa nas plantas (Stangarlin et al., 1999). Muitos compostos secundários de plantas medicinais também apresentam atividade antimicrobiana (Benett & Wallsgrove, 1994).

Stangarlin et al. (1999) demonstraram que extrato bruto de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerona (*Origanum majorana*), alfavaca *(Ocimun basilicum*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), babosa (*Aloe vera*), mil folhas (*Achillea millefolium*), orégano (*Origanum vulgare*), cardo santo (*Argemone mexicana*), pitanga (*Stenocalyx michelli*), erva cidreira (*Lippia alba*), poejo (*Mentha pulegium*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), romã (*Punica granatum*), goiabaiera vermelha (*Psidium guaiava* var. *pomifera*), eucalipto lima (*Eucaliptus citriodora*), manjericão (*Ocimum basilicum*), arruda (*Ruta graveolens*) e carqueja (*Baccharis trimera*) promoveram a indução da produção de fitoalexinas, caracterizando a atividade eliciadora.

Bastos (1997), utilizando o óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora, P. parasitica, Colletotrichum gleosporioides*, *Sclerotium coffeiculum*, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, *Cylindrocladium scoparium* e *Curvularia eragrostidis,* observou inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fungos.

Santos (1998) observou que o extrato obtido de erva cidreira inibiu a formação de apressórios na germinação *in vitro* de conídios de *Colletotrichum gleosporioides.*

Stangarlin et al. (1999) constataram que os extratos brutos de arruda e manjericão inibiram totalmente o crescimento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*.

Franzener (2003) utilizou o extrato bruto de cânfora (*Artemisia camphorata*) para induzir resistência à *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo. Detectou uma redução do número e tamanho das lesões em plantas tratadas com cânfora antes da inoculação do patógeno em relação às plantas não induzidas.

Vigo (2002) utilizou a tintura vegetal de *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro) no controle de *Microsphaeria diffusa* (oídio) em plantas de soja. Determinou um efeito indutor de resistência e/ou fungitóxico de *P. glomerata* à *M. diffusa,* indicando o potencial desta planta medicinal no controle do oídio da soja.

Cordeiro (2003) avaliou extrato de folhas e óleo emulsionável de nim (*Azadirachta indica*) no controle de oídio de tomateiro, causado por *Oidium lycopersici*. Enquanto os extratos de folhas não foram efetivos no controle, o óleo emulsionável controlou a doença nos mesmos níveis que o fungicida recomendado para a cultura (triforine).

Isto demonstra que as substâncias do metabolismo secundário de plantas medicinais são uma vasta fonte de moléculas químicas com potencial para o controle de doenças de plantas.

2.5 A CÚRCUMA E SEU USO PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta da família *Zingiberaceae*, originária do sudeste asiático. O interesse econômico da cultura está baseado nos principais componentes qualitativos dos rizomas: corante curcumina e óleos essenciais (Cecílio Filho, 1996).

Utilizada desde a antiguidade na medicina e gastronomia do oriente, a cúrcuma vem se tornando importante, atualmente, no combate a vários problemas de saúde humana, podendo-se destacar alguns efeitos de seus componentes como: antiinflamatório (Araújo&Leon, 2001; Balasubramanyam et al., 2003), antioxidante (Lean & Mohamed, 1999; Scartezzini & Speroni, 2000; Balasubramanyam et al., 2003) e atividades contra protozoários (Araújo et al. 1998 e 1999), bactérias (Uechi et al., 2000), fungos (Apisariyakul et al., 1995), e nematóides (Araújo & Leon, 2001). Outros trabalhos também relatam que a cúrcuma promove benefícios como a inibição do vírus da imunodeficiência humana Tipo-1 (Mazumder et al., 1995), além de possuir atividade antitumorígena (Surh, 2002), anticarcinogênica (Lin & Lin-Shiau, 2001) e atividade antimutagênica (Araújo & Leon, 2001; Shukla et al., 2002). Balasubramanyam et al. (2003) determinaram que a curcumina apresenta ação inibitória sobre a atividade da proteína-kinase C, determinando um importante potencial terapêutico no tratamento da diabetes. Miquel et al. (2002) relataram que extratos hidroalcóolicos de rizoma de cúrcuma e curcumina diminuiam o risco cardiovascular em humanos.

As ações citadas estão ligadas a uma série de compostos presentes no rizoma da cúrcuma. Este rizoma é muito rico em compostos fenólicos benéficos, como os curcuminóides. Os curcuminóides estão quimicamente relacionados ao seu

principal ingrediente, a curcumina. Três principais curcuminóides foram isolados da cúrcuma: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina (Balasubramanyam et al., 2003).

O *Zingiber officinale* (gengibre), pertencente também à família *Zingiberaceae*, apresenta potencial de controle de fungos fitopatogênicos. Rodrigues et al. (1999) avaliaram o potencial fungitóxico do gengibre em *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum graminicola*. *In vitro*, verificou-se a inibição do crescimento micelial dos fungos pelos extratos brutos nas concentrações acima de 5% e pelos óleos essenciais nas alíquotas acima de 20 µL. Em casa de vegetação, estudou-se o efeito da irrigação do extrato bruto (caldo), água aromatizada e adição de resíduo sobre a emergência, altura das plantas e massa fresca e seca de parte aérea e raiz de feijoeiro plantado em solo infestado com *S. rolfsii*. A irrigação com caldo e a cobertura morta proporcionaram plântulas com altura e massas superiores à testemunha.

O uso de extrato de cúrcuma para o controle de fitopatógenos é relatado por Saju et al. (1998), que determinaram a atividade fungistática através da inibição do crescimento micelial *in vitro* contra *Colletrotrichum gleosporioides, Sphaceloma cardamoni*, *Pestalotia palmarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. Singh & Rai (2000) verificaram que o extrato de cúrcuma apresentou fungitoxicidade *in vitro* através da inibição do crescimento micelial de *Fusarium udum*. Raja & Kurucheve (1998) obtiveram redução no crescimento e na germinação *in vitro* do escleródio de *Macrophomina phaseolina* com extrato de cúrcuma.

Kuhn (2003) estudou o efeito do extrato aquoso de cúrcuma em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *In vitro*, o extrato de cúrcuma apresentou

ação bactericida. *In vivo*, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno.

Singh at al. (2002) estudaram o efeito de óleos essenciais de *C. longa* sobre vários fungos. O óleo essencial na concentração de 1000 ppm causou inibição micelial completa em *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* e a 2000 ppm em *Curvularia pallescens, Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*.

Conforme relatado, é comprovada a ação antifúngica de substâncias presentes nos extratos e óleos essenciais de cúrcuma, sugerindo seu uso para o controle de outros fungos fitopatogênicos. Não foi encontrada qualquer referência específica da cúrcuma na atividade eliciadora dos mecanismos de defesa das plantas, mas baseado na vasta atividade dos produtos do metabolismo secundário da mesma, justifica-se tal estudo no tomateiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento e cultivo do patógeno e todos os ensaios e testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon, no período de abril de 2003 a dezembro de 2004.

3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DO PATÓGENO DESAFIADOR

Foram utilizados isolados obtidos a partir de lesões de plantas de tomateiro infectadas naturalmente com *Alternaria solani* coletadas no município de Marechal Cândido Rondon/PR. O fungo foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), sendo incubado a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.2 ENSAIOS *IN VITRO* PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Foram realizados três testes para determinar a atividade fungitóxica direta.

3.2.1 Teste de Inibição do Crescimento Micelial

Os rizomas de cúrcuma (Figura 1) foram coletados na região de Mercedes-PR e armazenados a -20 ºC. Os rizomas foram triturados com o auxílio de liquidificador, em caldo de batata, na dosagem de 200 g de rizoma L^{-1}. O homogenato foi filtrado em gaze e papel de filtro Whatman Nº 1 para a eliminação de restos de células, constituindo um extrato líquido a 20%. Este extrato foi diluído com caldo de batata para se obter extrato bruto (EB) a 1%, 5% e 10%. Em todas as concentrações foram adicionados dextrose e ágar para completar o meio de cultura BDA, as quais foram autoclavadas a 120 ºC e 1 atm por 20 min.

A curcumina purificada a partir da *C. longa* é uma substância comercial disponível e neste trabalho foi utilizada CURCUMINA PS da Merck (nº produto 820354). A partir desta substância foi feita uma solução estoque (10 mg mL^{-1}) com álcool etílico absoluto. A partir desta, foram incorporadas alíquotas em meio de cultura BDA já autoclavado e semi-fundente para obter concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg L^{-1}.

a b

Figura 1. Planta (a) e rizoma (b) de cúrcuma (*C. longa*).

Foi feito um controle com o meio BDA puro e um controle com etanol para determinar o efeito deste nos tratamentos com curcumina. Os tratamentos e suas doses são apresentados na Tabela 1. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos testes de crescimento micelial e inibição de esporulação *in vitro* de *A. solani.*

	Tratamentos
1	EB cúrcuma 1%
2	EB cúrcuma 5%
3	EB cúrcuma 10%
4	EB cúrcuma 20%
5	Curcumina 50 mg L^{-1}
6	Curcumina 100 mg L^{-1}
7	Curcumina 200 mg L^{-1}
8	Curcumina 400 mg L^{-1}
9	Controle etanol 4%[1]
10	Testemunha

[1]Equivalente à quantidade máxima de etanol presente em BDA nos tratamentos com curcumina.

Um disco de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *A. solani* (retirado de uma colônia de 14 dias em BDA) foi repicado para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 ºC, sob fotoperíodo de 12 h.

As avaliações foram realizadas através de medições do diâmetro das colônias fúngicas (média de duas medidas diametralmente opostas) quando as estas atingiram ¾ da superfície da placa (Stangarlin et al., 1999). A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculado para cada dosagem em relação à

testemunha. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se análise de regressão a 5 % de probabilidade. A concentração efetiva para a inibição do crescimento micelial em 50% (EC_{50}) foi estimada através de equação da regressão linear.

3.2.2 Teste de Inibição da Esporulação

Ao término do teste de inibição de crescimento micelial, foi avaliada a esporulação de cada uma destas colônias. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos através da adição de 10 mL de água destilada na placa, raspagem da colônia com bastão de vidro e filtragem em gaze, sendo determinado o número de esporos mL^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer ao microscópio ótico. Posteriormente, determinou-se o número de esporos cm^{-2} de colônia utilizando os resultados do teste de crescimento micelial.

Os dados de inibição da esporulação, em porcentagem, foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se análise de regressão a 5% de probabilidade.

3.2.3 Esterilização por Filtração

Foi realizada esterilização por filtração, em membrana Millipore de 0,45 µm de diâmetro de poro, dos EB de cúrcuma a 10 e 15% para verificar o possível efeito da autoclavagem nos extratos.

Foram triturados rizomas de cúrcuma com o auxílio de liquidificador, em caldo de batata, na dosagem de 150 g L^{-1} constituindo um extrato líquido a 15%. O homogenado foi filtrado em gaze e centrifugado a 6500 *g* durante 20 min para a eliminação de restos de células. O sobrenadante foi centrifugado uma segunda vez (6500 *g*, 20 min) e o líquido sobrenadante resultante foi filtrado em membrana Millipore para reter as bactérias contaminantes. O extrato foi adicionado com dextrose, ágar e caldo de batata autoclavados nas concentrações adequadas para obter-se EB a 10 e 15% de cúrcuma em meio de cultura BDA. Os testes de inibição do crescimento micelial e de inibição da esporulação foram realizados seguindo a metodologia relatada em 3.2.1 e 3.2.2.

Os dados de inibição de crescimento micelial e inibição da esporulação, em porcentagem, foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

3.2.4 Teste de Inibição da Germinação de Esporos

O ensaio foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os tratamentos utilizados são apresentados na Tabela 2.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão de esporos (3 x 10^{4} conídios mL^{-1}) e outra de 50 µL das concentrações de EB de cúrcuma e curcumina, corrigidas para se manter os mesmos valores indicados no item 3.2.1, foram colocadas juntas em lâmina de microscopia revestida por uma camada delgada de ágar-água a 1% (700 uL).

Tabela 2. Tratamentos utilizados no teste de inibição da germinação de esporos *in vitro* de *A. solani*.

	Tratamentos
1	EB cúrcuma 1% sem autoclavar
2	EB cúrcuma 1% autoclavado
3	EB cúrcuma 5 % sem autoclavar
4	EB cúrcuma 5 % autoclavado
5	EB cúrcuma 10% sem autoclavar
6	EB cúrcuma 10% autoclavado
7	EB cúrcuma 20 % sem autoclavar
8	EB cúrcuma 20 % autoclavado
9	Curcumina 50 mg L^{-1}
6	Curcumina 100 mg L^{-1}
7	Curcumina 200 mg L^{-1}
8	Curcumina 400 mg L^{-1}
9	Controle etanol 10 %[1]
10	Testemunha

[1]Equivalente à quantidade máxima de etanol presente em BDA nos tratamentos com curcumina.

Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida no escuro a 25 ºC e a porcentagem de germinação determinada 12 h após, momento no qual é máxima a germinação de esporos de *A. solani* (determinado em 3.2.5). O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do esporo (Bergamin Filho, 1995). Foram contados 300 esporos por tratamento.

Os dados de inibição da germinação de esporos em porcentagem foram analisados estatisticamente pela análise de variância, aplicando-se análise de regressão a 5% de probabilidade. Para análise, os dados foram previamente transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$.

3.2.5 Curva de Germinação de Esporos

Com o objetivo de avaliar o período necessário para a máxima germinação de esporos de *A. solani*, foi estabelecida uma curva de germinação de esporos, relacionando a porcentagem de germinação com o tempo necessário para a germinação.

Uma alíquota de 80 µL de suspensão de esporos (calibrada para concentração de 2 x 10^{4} conídios mL^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer), foi colocada em cada um dos recipientes (pocinhos) de uma placa usada no teste de ELISA (Regente et al., 1997). A paralisação da germinação foi feita através do emprego de 10 µl de azul de algodão com lactofenol, no tempo 0 e a cada 2 h em 5 repetições (pocinhos), até 24 h, totalizando 13 tempos de avaliação. Ao final, realizou-se a observação dos esporos germinados ao microscópio ótico.

3.3 ENSAIOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE CONTROLE DE PINTA PRETA E DETERMINAÇÃO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *A. solani.*

Os ensaios foram conduzidos em cultivo protegido na área pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste de Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon, no período de março a outubro de 2004.

3.3.1 Produção de Mudas e Implantação dos Ensaios

Sementes de tomateiro da cultivar Bônus F1 foram semeadas no dia 3 de março de 2004 em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato Plantmax HA®.

Para a implantação do ensaio 1, as mudas foram transplantadas aos 28 dias após a semeadura (DAS) para canteiros em casa de vegetação. O espaçamento adotado foi 1,2 m entre linhas e 0,6 m entre plantas na linha. Utilizaram-se as quatro linhas centrais para o ensaio, deixando-se duas linhas de bordadura. Neste ensaio, a acidez do solo foi corrigida através de calcário (1500 kg ha^{-1}) e a adubação de base foi feita com 3000 kg ha^{-1} da fórmula 4-14-8 (NPK) mais micronutrientes. Após o transplante, iniciou-se a fertirrigação por gotejamento de 3 em 3 dias, sendo a quantidade de água estimada de 1 L $planta^{-1}$ dia^{-1}. Foram utilizados os fertilizantes solúveis KRISTALON da HYDRO, segundo as seguintes dosagens: de 15 a 45 dias após transplante (DAT), KRISTALON branco (15-5-30) na dosagem de 0,6 g L^{-1} dia^{-1}, nitrato de cálcio 0,3 g L^{-1} dia^{-1} e HYDRO cocktail 4 g L^{-1} dia^{-1}; de 45 a 75 DAT, KRISTALON laranja (6-12-36) na dosagem de 0,4 g L^{-1} dia^{-1}, nitrato de cálcio 0,7 g L^{-1} dia^{-1} e HYDRO cocktail 5 g L^{-1} dia^{-1}; de 75 DAT até o final, KRISTALON laranja (6-12-36) na dosagem de 1 g L^{-1} dia^{-1}, nitrato de cálcio 0,3 g L^{-1} dia^{-1} e HYDRO cocktail 5,8 g L^{-1} dia^{-1}.

Para a implantação do ensaio 2, as mudas foram transplantadas aos 28 DAS para vasos de 4 L contendo solo e composto orgânico curtido na proporção de 2:1, respectivamente, sendo mantidas em casa de vegetação até o término do experimento.

3.3.2 Montagem dos Ensaios e Avaliações

Ensaio 1. Este ensaio foi utilizado para avaliar o controle da doença na planta inteira. Os tratamentos testados e suas doses são apresentados na Tabela 3.

O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições, sendo cada parcela composta por cinco plantas. Foram feitas seis aplicações dos tratamentos aos 33, 50, 65, 83, 102 e 123 DAT. As aplicações foram realizadas com pulverizador manual até plena cobertura foliar. As plantas foram inoculadas duas vezes. A primeira inoculação foi feita aos 36 DAT na concentração de $1x10^4$ conídios mL^{-1}. Realizou-se uma segunda inoculação aos 53 DAT na concentração de $3,6 \times 10^4$ conídios mL^{-1} devido à ausência de sintomas da doença na planta até essa data. Nas duas inoculações foi adicionado o espalhante Tween-20 (uma gota por 300 mL).

Tabela 3. Tratamentos utilizados no ensaio *in vivo* 1.

	Tratamentos
1	EB cúrcuma 1%
2	EB cúrcuma 10 %
3	Curcumina 50 mg L^{-1}
4	Curcumina 100 mg L^{-1}
5	Acibenzolar-S-metil (2,5 g 100 L^{-1} de i.a.)[1]
6	Azoxystrobin (40 g L^{-1} de i.a.)[2]
7	Oxicloreto de cobre (110 g L^{-1} de i.a.)[3]
8	Testemunha (água)

[1] Indutor de resistência registrado para a cultura do tomateiro.
[2,3] Fungicida sistêmico e protetor registrado para a cultura de tomateiro.

Os parâmetros avaliados neste ensaio foram:

a) Severidade da doença nas folhas. A severidade da pinta preta foi avaliada através de adaptação da escala diagramática de Boff (1988), em que se atribuíram notas: 1 - ausência de sintomas; 2 - de traços de sintomas a 4% de severidade; 3 – 4,1 a 8%; 4 - 8,1 a 16%; 5 – 16,1 a 32%; 6 – acima de 32% de área foliar lesionada (Figura 2).

Notas: 1 2 3 4 5 6

Figura 2. Escala diagramática adaptada de Boff (1988) para avaliação de severidade de pinta preta em folíolo de tomateiro.

Foram realizadas sete avaliações (68, 77, 83, 91, 105, 131 e 152 DAT) adotando-se como padrão a escolha ao acaso de cinco folíolos por planta, pertencentes aos terços médio e inferior das três plantas centrais da parcela. A primeira avaliação foi realizada quando as plantas controle apresentaram sintomas.

Com as avaliações de severidade de pinta preta nas folhas, foram traçadas as curvas de progresso da doença. A partir das curvas, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da equação:

$$AACPD = \sum_{i}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) \times 0,5] [t_{i+1} - t_i]$$

em que:
n = número de avaliações
y = intensidade da doença na i-ésima avaliação
t = tempo no momento da i-ésima avaliação

A porcentagem de redução de área foliar foi avaliada através de análise visual das três plantas centrais da parcela, sendo realizada 10 dias após a última avaliação de severidade em folha.

b) Severidade da doença na haste. A severidade da pinta preta na haste foi avaliada através da escala diagramática adaptada de Fancelli (1991) em que se atribuíram notas: 1 - ausência de sintomas, 2 - lesões menores que 0,3 cm; 3 - lesões entre 0,3 e 3 cm, 4 - lesões maiores que 3 cm, 5 - lesões que circundavam toda a haste. A avaliação na haste foi realizada no mesmo período e nas mesmas plantas da avaliação de redução da área foliar.

Com os dados de severidade em folhas, AACPD, porcentagem de redução de área foliar e severidade em hastes foi feita a análise de variância, aplicando-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade para comparação das médias. Para análise, os dados de redução de área foliar foram previamente transformados em arc sen $\sqrt{x}/100$.

c) Número de frutos sadios, massa fresca de frutos, classificação de frutos e produção comercial. Foram avaliados através de contagens e pesagens de todos os frutos colhidos das três plantas centrais das diferentes colheitas. Para a análise estatística tomaram-se os dados totais das diferentes colheitas, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A classificação de frutos por tamanho foi avaliada utilizando-se uma adaptação da atual proposta do Programa Brasileiro para Melhoria dos Padrões Comerciais e Embalagens de Hortigranjeiros em que foram considerados: frutos pequenos – diâmetro de 40 a 50 mm; frutos médios – de 51 a 60 mm; e frutos grandes – acima de 61 mm. Posteriormente, foram calculados as porcentagens de frutos por tamanho e, antes da análise estatística, transformados em arc sen $\sqrt{x}/100$.

Para o cálculo de produção comercial foram considerados somente aqueles frutos com diâmetro maior que 40 mm e calculada a produção por planta.

Ensaio 2. Este ensaio foi utilizado para determinar a indução de resistência na planta através da avaliação da severidade da doença. Os tratamentos e as doses utilizadas são apresentados na Tabela 4. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com 14 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição representada por uma planta.

Tabela 4. Tratamentos utilizados no ensaio *in vivo* 2.

	Tratamentos
1	EB cúrcuma 1%
2	EB cúrcuma 10 %
3	Curcumina 50 mg L^{-1}
4	Curcumina 100 mg L^{-1}
5	Acibenzolar-S-metil (2,5 g 100 L^{-1} de i.a.)
6	Testemunha (água)

A 7ª folha da planta recebeu EB de cúrcuma, curcumina ou acibenzolar-S-metil (ASM) por aspersão até o ponto de escorrimento. Setenta e duas horas após a

aplicação dos tratamentos, a 7ª folha tratada e a 8ª folha (não tratada) foram inoculadas com o patógeno, segundo o procedimento utilizado por Franzener (2003).

Para garantir o sucesso da inoculação artificial, as plantas foram mantidas sob condições de alta umidade relativa, cobertas com sacos plásticos vedados na base do vaso, durante 24 h antes e após a inoculação. A suspensão de esporos foi pulverizada aos 29 DAT na concentração de $1x10^4$ conídios mL^{-1}. Foi adicionado o espalhante Tween-20 na suspensão de esporos (uma gota por 300 mL). Após este período, as plantas foram mantidas em casa de vegetação.

A severidade da doença foi avaliada através do número de lesões nas 7ª e 8ª folhas aos 56 DAT e da porcentagem de área foliar lesionada nas 7ª e 8ª folhas aos 69, 75 e 82 DAT. Com os dados de porcentagem de área foliar lesionada por pinta preta na folha, determinou-se a AACPD usando a metodologia descrita para o ensaio 1.

Com os dados de número de lesões e AACPD foi feita a análise de variância, aplicando-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade para comparação das médias. Para análise, os dados de número de lesões foram previamente transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$ e os de a AACPD em $\sqrt{(x+1,0)}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CURVA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS

A curva de germinação *in vitro* de esporos de *A. solani* pode ser observada na Figura 3. Verifica-se que a germinação máxima (70%) ocorre após 20 h de incubação, mas a partir das 12 h a germinação alcança o platô.

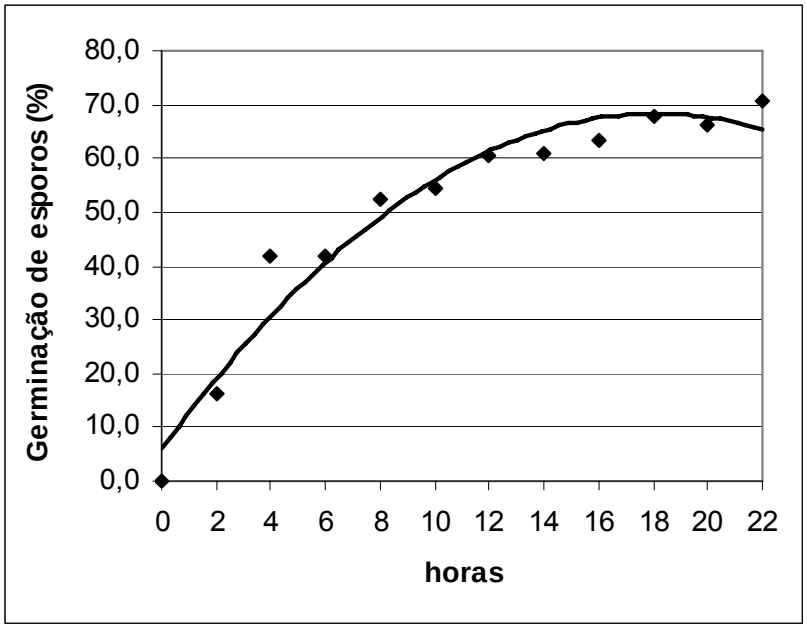

Figura 3. Curva de germinação *in vitro* de esporos de *A. solani.*

4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

4.2.1 Extrato de Cúrcuma

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato autoclavado dos rizomas de cúrcuma sobre o crescimento micelial de *A. solani* não foi significativa, ao contrário do efeito sobre a esporulação do fungo, que pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Efeito do extrato bruto autoclavado de *C. longa* sobre a esporulação *in vitro* de *A. solani.*

Tratamento	Inibição de esporulação (%)
Controle (apenas BDA)	0
Extrato bruto (%):	
1	50,2
5	45,6
10	42,4
20	78,6
Equação de regressão	24,0896 + 2,6729 x
R^2	0,60

O máximo de inibição da esporulação (78,6%) foi alcançado com a concentração de 20% de EB de cúrcuma, embora já ocorrera uma inibição média de 46% com as menores concentrações testadas.

Com o objetivo de verificar um possível efeito deletério da autoclavagem nos extratos aquosos de cúrcuma, foram realizados testes de inibição de crescimento micelial e de esporulação utilizando extratos esterilizados por filtração. Para este fim, usou-se as concentrações de 10% e 15% de extrato de cúrcuma. Os dados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito do extrato bruto de *C. longa* esterilizado por filtração sobre o crescimento micelial (CM) e a esporulação *in vitro* de *A. solani.*

Tratamento	Inibição de CM (%)	Inibição de esporulação (%)
Controle (apenas BDA)	0 c[1]	0 b
Extrato bruto (%):		
10	38,2 a	71,7 a
15	23,2 b	87,1 a
CV (%)	21,4	18,1

[1] Médias na coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Houve inibição do crescimento micelial pelos EB não autoclavados, alcançando o nível de 38,2% com EB 10%. No caso da esporulação do fungo, a concentração de EB 10% inibiu 71,7%, o que significou 29,3% a mais do que a inibição obtida com o EB autoclavado. Já na concentração de EB 15%, a inibição foi de 87% da esporulação, valor 8,5% mais alto do aquele obtido com EB 20% autoclavado.

Foi verificado o efeito dos EB não autoclavados na germinação de esporos *in vitro*, alcançando inibições de 15% (Tabela 7). Os EB autoclavados não inibiram a germinação de esporos indicando a presença de algum composto termolábil.

Tabela 7. Efeito do extrato bruto de *C. longa* não autoclavado sobre a germinação de esporos *in vitro* de *A. solani*.

Tratamento	Inibição da germinação de esporos (%)[2]
Controle 1[1]	0
EB (%):	
1	1,7
5	15,0
10	9,0
20	8,0
Equação de regressão	$0,010538 + 0,4676\ x - 0,01905\ x^2$
R^2	0,744

[1] Apenas ágar-água 1%;
[2] Médias originais. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$.

A existência de diferentes níveis de inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos de *A. solani* entre os extratos autoclavados e não autoclavados poderia estar associado a um efeito negativo da alta pressão e temperatura do processo de autoclavagem sobre algum composto do rizoma de cúrcuma responsável pela atividade antifúngica, o qual seria termolábil.

Segundo estes resultados, a atividade antifúngica *in vitro* dos EB de cúrcuma, estaria baseada fundamentalmente na inibição da esporulação, e em menor grau no crescimento micelial e na inibição da germinação de esporos.

4.2.2 Soluções de Curcumina

O efeito das concentrações de curcumina sobre o crescimento micelial de *A. solani in vitro* pode ser observado na Tabela 8. São apresentados também os dados

de inibição do crescimento micelial descontando o efeito do etanol utilizado como solvente da curcumina.

Tabela 8. Efeito de curcumina sobre o crescimento micelial (CM*) in vitro* de *A. solani.*

Tratamento	Inibição de CM (%)	Inibição de CM descontando-se o efeito do etanol (%)
Controle 1[1]	0	0
Controle 2[2]	55,22	0
Curcumina (mg L^{-1}):		
50	62,43	7,21
100	60,46	5,24
200	77,06	21,84
400	84,71	29,49
Equações de regressão	57,889 + 0,0708x	2,739 + 0,0706x
R^2	0,8809	0,883

[1] Apenas BDA;
[2] BDA + 4% de etanol.

Houve inibição do crescimento micelial para doses crescentes de curcumina pela ocorrência de regressão linear significativa a 1% (Figura 4). Quando descontado o efeito do etanol, o máximo de inibição de crescimento micelial foi de 29,5% na maior concentração de curcumina testada (400 mg L^{-1}).

A curcumina apresentou valores de EC_{50} estimados em 669,42 mg L^{-1} sobre o crescimento micelial de *A. solani*. Estes valores permitem classificar a curcumina como uma substância química de pouca ação fungitóxica para o crescimento micelial de *A. solani*, pois segundo a classificação dos níveis de toxidez para fungos estabelecida por Edgington et al. (1971), compostos com EC_{50} > 50 µg/mL podem ser considerados como pouco fungitóxicos.

Em relação à ação da curcumina sobre a esporulação *in vitro*, o único efeito verificado foi devido ao etanol utilizado como solvente. Também não houve efeito da curcumina na germinação de esporos *in vitro*. Deste modo, a curcumina não estaria interferindo na etapa de infecção (penetração do fungo na planta) podendo estar atuando através de outros mecanismos em etapas posteriores do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, como na colonização.

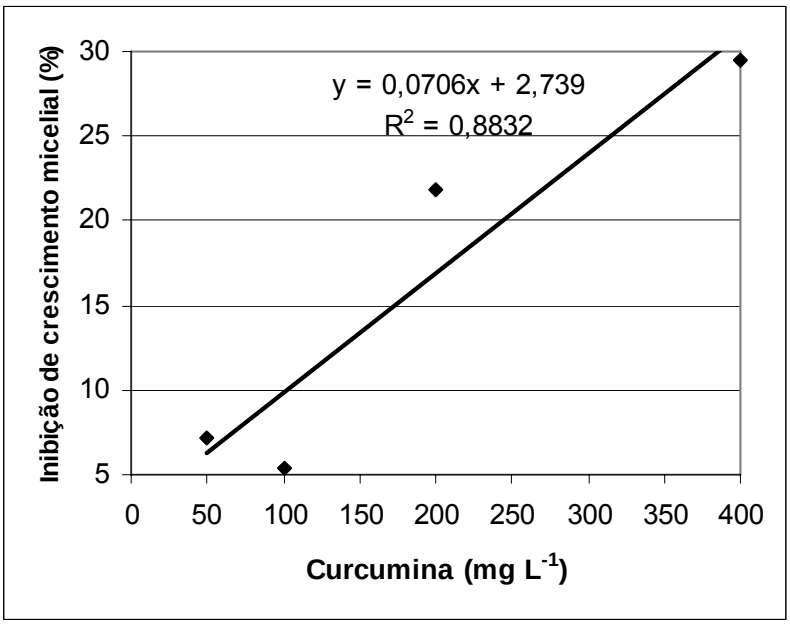

Figura 4. Ajuste da reta de inibição de crescimento micelial *in vitro* de *A. solani* em função da concentração de curcumina .

4.3 ENSAIOS *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE CONTROLE DE PINTA PRETA E DETERMINAÇÃO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *A. solani.*

4.3.1 Ensaio 1

A pinta preta apresentou elevada severidade, determinada pelas inoculações realizadas com esporos do patógeno e favorecida pela suscetibilidade da cultivar e pela ocorrência de condições ambientes favoráveis à doença. Os valores de temperatura e umidade relativa máximos, mínimos e médios semanais registrados durante a execução do ensaio são apresentados no Quadro 1 do apêndice.

Na primeira avaliação da doença, aos 68 DAT (Tabela 9), todos os tratamentos, exceto o azoxystrobin, foram iguais à testemunha.

Tabela 9. Severidade de pinta preta em folhas de tomateiro tratadas com diferentes produtos.

TRATAMENTOS	Severidade de pinta preta[1]					
	68 DAT[2]	77 DAT	91 DAT	105 DAT	131 DAT	152 DAT
Cúrcuma 1%	1,31 a[3]	1,87 cd	3,45 bc	3,22 bc	3,68 bc	4,02 b
Cúrcuma 10 %	1,66 a	2,10 bc	3,33 bc	3,32 bc	3,75 bc	4,22 b
Curcumina 50 mg L^{-1}	1,38 a	2,12 bc	3,28 c	3,05 bc	3,52 bcd	4,05 b
Curcumina 100 mg L^{-1}	1,58 a	2,24 bc	3,47 bc	3,22 bc	3,75 bc	4,02 b
ASM[4]	1,62 a	2,58 ab	4,05 b	3,88 ab	4,37 ab	4,40 b
Azoxystrobin	0,71 b	1,33 d	2,77 c	2,45 c	2,73 d	2,98 c
Oxicloreto de Cu	1,36 a	2,29 bc	3,45 bc	3,02 bc	3,28 cd	3,93 b
Testemunha	1,68 a	2,93 a	5,05 a	4,60 a	4,98 a	5,35 a
CV (%)	17,3	11,9	8,6	12,0	10,1	9,4

[1] Notas: 1(ausência de sintomas), 2 (traços a 4%), 3 (4,1-8%), 4 (8,1-16%), 5 (16,1-32%), 6 (> 32%);
[2]DAT: dias após transplante;
[3]Médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;
[4]Acibenzolar-S-metil.

Os tratamentos de cúrcuma 1% e 10%, curcumina 50 e 100 mg L^{-1} e oxicloreto de cobre apresentaram controle intermediário e superior à testemunha. O tratamento com ASM nas avaliações de 77, 105 e 131 DAT não diferiu estatisticamente da testemunha. Na última avaliação, aos 152 DAT, o tratamento com azoxystrobin foi mais eficiente, diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos. Estes não diferiram entre si, mas foram superiores estatisticamente em termos de controle à testemunha.

Foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para comparar os tratamentos (Tabela 10). Através desta variável é possível resumir as diferentes avaliações obtendo um único valor para discriminar tratamentos.

Tabela 10. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta em tomateiro e porcentagem de redução de área foliar (AF) causada pela doença em função de diferentes tratamentos em plantas mantidas em cultivo protegido.

TRATAMENTOS	AACPD	% Redução de AF aos 162 DAT[2]
Cúrcuma 1%	1,03 c[1]	37,50 ab
Cúrcuma 10 %	1,12 bc	37,50 ab
Curcumina 50 mg L^{-1}	1,09 c	37,50 ab
Curcumina 100 mg L^{-1}	1,11 bc	35,00 ab
ASM	1,25 b	41,25 a
Azoxystrobin	0,71 d	20,00 c
Oxicloreto de Cu	1,08 c	27,50 bc
Testemunha	1,43 a	46,25 a
C.V. (%)	6,3	14,5

[1]Médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;
[2] Valores obtidos aos 162 dias após o transplante. Médias originais. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen√(x/100).

Todos os tratamentos de controle apresentaram um valor de AACPD estatisticamente menor à testemunha. Dentro deles, o tratamento com ASM foi o

tratamento menos eficiente, mas não diferiu estatisticamente de cúrcuma 10% e curcumina 100 mg L^{-1}. Cúrcuma 1%, curcumina 50 mg L^{-1} e oxicloreto de cobre apresentaram melhor nível de controle, mas inferior estatisticamente ao controle realizado pelo fungicida azoxystrobin.

A menor redução de área foliar na planta de tomateiro foi observada nas parcelas pulverizadas com azoxystrobin, mas não diferiu estatisticamente com o tratamento com oxicloreto de cobre (Tabela 10). A redução de área foliar nos outros tratamentos não diferiu com a testemunha.

Quanto à pinta preta na haste, o nível de severidade no ensaio foi muito baixo e nenhum tratamento apresentou diferenças estatísticas com a testemunha.

Não houve diferenças estatísticas na produção comercial de frutos (Tabela 11), no número de frutos comerciais nem na massa fresca média de frutos entre tratamentos nem entre tratamentos e testemunha. Não foram constatados frutos doentes com sintomas de pinta preta no ensaio.

A produtividade do ensaio foi muito superior à média nacional. Embora as diferênças entre tratamentos não tenham sido estatisticamente significativas, o tratamento com curcumina 50 mg L^{-1} determinou uma produção 13,6% (0,8 kg/planta) maior do que a testemunha.

Quanto à porcentagem de frutos por tamanho, o tratamento de curcumina 50 mg L^{-1} foi o único que apresentou menor porcentagem de frutos pequenos e maior porcentagem de frutos grandes em relação à testemunha. Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos na porcentagem de frutos médios.

Tabela 11. Produção comercial de tomateiro mantido em cultivo protegido e porcentagem de frutos comerciais (frutos pequenos, médios e grandes) em plantas inoculadas com *A. solani* e tratadas com diferentes produtos.

TRATAMENTOS	Produção comercial (kg/planta)	Porcentagem de frutos /tamanho		
		Pequenos diâmetro 41 a 50 mm	Médios diâmetro 51 a 60 mm	Grandes diâmetro > 61 mm
Cúrcuma 1%	6,56	19,30 ab[1]	44,28 a	36,42 ab
Cúrcuma 10 %	5,80	21,75 ab	45,74 a	32,51 ab
Curcumina 50 mg L^{-1}	6,72	17,15 b	44,53 a	38,32 a
Curcumina 100 mg L^{-1}	6,06	20,37 ab	45,32 a	34,32 ab
ASM[2]	5,89	24,27 ab	52,94 a	22,79 ab
Azoxystrobin	6,14	29,79 ab	41,36 a	28,85 ab
Oxicloreto de Cu	6,65	27,42 ab	46,57 a	26,01 ab
Testemunha	5,90	31,71 a	47,20 a	21,09 b
CV (%)	10,5	13,5	10,5	13,3

[1]Médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Médias originais. Para análise estatística, os dados foram transformados em arc sen√(x/100);
[2] Acibenzolar-S-metil.

De maneira geral, no ensaio 1 verificou-se elevada severidade de pinta preta, com reflexos negativos na área foliar das plantas, mas sem afetar a produção, número e massa fresca dos frutos. A utilização dos tratamentos reduziu a severidade da doença. Os tratamentos de extrato bruto de cúrcuma e de curcumina apresentaram nível de controle igual ao tratamento com cobre, mas menor controle do que o tratamento com estrobirulinas (azoxystrobin).

Comparado ao controle realizado por ASM, os tratamentos com EB de cúrcuma e curcumina foram similares e até superiores, no caso de EB 1% e curcumina 50 mg L^{-1}. Em trabalhos realizados com ASM como indutor de resistência contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro, houve proteção contra os dois primeiros patógenos mas não contra *Septoria lycopersici* (Silva, 2002).

A utilização de extrato bruto de cúrcuma ou curcumina poderia ser uma opção de controle em cultivos orgânicos, já que apresenta níveis de controle e produtividade similares aos obtidos com fungicidas cúpricos. Além disso, o custo de controle com estes produtos seria inferior ao controle com fungicidas do cultivo convencional, fato este que, associado ao melhor preço do tomate cultivado organicamente, renderia ao produtor um lucro relativamente maior.

Quanto à qualidade de fruto, somente o tratamento com curcumina 50 mg L^{-1} apresentou maior quantidade de frutos grandes e menor quantidade de frutos menores.

4.3.2 Ensaio 2

Nenhum dos tratamentos diferiu estatisticamente da testemunha em número de lesões na 7ª folha aos 27 dias após inoculação, embora os tratamentos de extrato bruto a 10% e ASM tenham sido, em média, 43% menores, evidenciando uma possível indução local de resistência (Tabela 12). Para a 8ª folha não tratada, mas inoculada, não houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha, o que poderia indicar somente uma ação local na 7ª folha do extrato de cúrcuma e da curcumina na planta.

A variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) resume as avaliações de severidade em porcentagem de área foliar aos 40, 46 e 53 dias após inoculação e ajuda na interpretação de avanço da doença nos diferentes tratamentos de controle (Tabela 13).

Tabela 12. Número de lesões de pinta preta nas 7ª e 8ª folhas de tomateiro cultivado em vaso aos 56 dias após o transplante.

TRATAMENTOS[1]	Nº de lesões[2,4]	
	7ª folha	8ª folha
Cúrcuma 1%	13,5 ab[3]	3,4 a
Cúrcuma 10 %	5,4 b	4,4 a
Curcumina 50 mg L^{-1}	14,5 a	9,8 a
Curcumina 100 mg L^{-1}	8,6 b	7,3 a
ASM	5,8 b	3,4 a
Testemunha (água)	9,8 ab	9,4 a
C.V. (%)	31,1	43,4

[1] Tratamentos realizados na 7ª folha, três dias antes da inoculação com o patógeno;
[2] Avaliado 27 dias após a inoculação nas 7ª e 8ª folhas;
[3] Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;
[4] Médias originais. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$

Somente os tratamentos de extrato de cúrcuma 10% e curcumina 100 mg L^{-1} apresentaram um valor de AACPD na 7ª folha estatisticamente menor à testemunha. O EB de cúrcuma 10% foi o tratamento que determinou maior controle da doença na 7ª folha, mas não diferiu estatisticamente da curcumina 50 mg L^{-1}, curcumina 100 mg L^{-1} e ASM.

Tabela 13. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para pinta preta nas 7ª e 8ª folhas de tomateiro cultivado em vaso.

TRATAMENTOS	AACPD		
	7ª folha	8ª folha	Total
Cúrcuma 1%	3,16 ab[1,2]	1,29 a	4,45
Cúrcuma 10 %	0,88 c	0,43 b	1,31
Curcumina 50 mg L^{-1}	1,72 abc	0,74 ab	2,46
Curcumina 100 mg L^{-1}	1,30 bc	0,63 ab	1,93
ASM	1,56 abc	0,73 ab	2,29
Testemunha (água)	2,84 a	1,22 a	4,07
C.V. (%)	25,5	17,4	25,5

[1]Médias nas colunas, seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade;
[2] Médias originais. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{(x + 1,0)}$.

Para a 8ª folha, somente o tratamento de extrato de cúrcuma 10% apresentou diferença significativa com a testemunha, embora não tenha sido diferente estatisticamente da curcumina 50 mg L^{-1}, curcumina 100 mg L^{-1} e ASM.

Esta menor severidade de doença na 8ª folha quando comparado à testemunha pode indicar uma indução de resistência do extrato de cúrcuma 10% na planta de tomateiro.

5 CONCLUSÕES

1 - O extrato bruto de cúrcuma apresenta compostos termolábeis com atividade antifúngica *in vitro* contra *A. solani*, determinada através da inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos.

2 – A curcumina apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra *A. solani* fundamentalmente através da inibição do crescimento micelial. Considerando sua EC_{50}, esta atividade poderia ser classificada como pouco fungitóxica.

3 – Os EB de cúrcuma e soluções de curcumina apresentaram níveis de controle de pinta preta, no campo, similares ao tratamento com fungicida cúprico (oxicloreto de cobre), mas inferior ao realizado com fungicida sistêmico (azoxystrobin).

4 – A aplicação de extrato de cúrcuma a 10% em plantas de tomateiro provoca uma possível indução de resistência sistêmica contra *A. solani*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 49, p. 163-169, 1995.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: *in vivo* experiments with diarylheptanoids from laguminoseae and Zingiberaceae plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 93(supl. II), p. 306, 1998.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L.L. Studies on de effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 791-794, 1999.

ARAUJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96(5), p. 723-728, 2001.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, A.A.; KUMAR, R.S.; MONICKARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: Novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**. v. 28. n. 6, p. 715-721. December 2003.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 22. n. 3, p. 441-443. set. 1997.

BENETT, R.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**. v. 127. p. 617-633, 1994.

BERGAMIN FILHO, A. A epidemia como um sistema. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 1995. v 1. cap. 29, p.574-601.

BOFF, P**. Epidemiologia e controle químico da mancha de estenfílio (*Stemphylium solani* Weber) e da pinta preta (*Alternaria solani* (Ellis & Martin)**

Jones & Grout) em dois sistemas de condução do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Viçosa MG, 1988. 192 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa.

BROWN J.E.; LU, T.Y.; STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; COLLINS, D.J.; WILSON, M.A.; IGWEGBE, E.C.K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. The effect of low dose ultraviolet light–C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot. **Crop Protection**, v. 20, p. 873-883, 2001.

CAMARGO FILHO, W.P., MAZZEI, A.R. Produção de tomate - sustentabilidade e preços. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.8, p.45-50, 2002.

CECÍLIO FILHO, A.B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. Lavras MG, 1996. 100 p. Tese. (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n.10, p. 34-40, 1999.

CORDEIRO, S.M. DE T.P.G. Efeito de extratos de folhas e de óleo de nim sobre o oídio de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 3, 263-265, 2003.

DONG, H.; WEIJIANG, L.; ZHANG, D.; TANG, W. Differential expression of induced resistance by an acqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against Verticillium wilt cotton. **Crop Protection**, v. 22. p. 129-134, 2003.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. 61: 42-44.1971.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Cultivo de tomate para industrialização. Importância econômica.** Disponível em:<http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/index.htm> Acesso em: 06 nov. 2003.

FANCELLI, M.I. **Comparação patogênica, cultural, serológica e eletroforética entre isolados de *Alternaria solani* do tomate e da batata e variabilidade patogênica de *Alternaria solani* f.sp. *lycopersici* N.F.** 1991. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W & JONES, R. L. (Eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, ASPP, 2000. p. 1102-1156.

KUHN, O.J. **Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. Marechal Cândido Rondon, 2003. 42 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Oeste de Paraná – Unioeste.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L. BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p.690-719.

LEAN, L.P.; MOHAMED, S. Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemon-grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and *Garcinia atriviridis* on butter cakes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79(13), p. 1817-1822, 1999.

LIN, J.K.; LIN-SHIAU, S.Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences.** v. 25(2), p. 59-66, 2001

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. dos; AVILA, A.C. de; BEZERRA, I.C.; CHARCHAR, J.M.; QUEZADA-DUVAL, A.M. Doenças: Identificação e Controle. In: SILVA, J.B. da; GIORDANO, L de B. (org). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa Hortaliças, 2000. p. 88-111.

MAZUMDER, A.; RAGHAVAN, K.; WEINSTEIN, J.; KOHN, K.W.; POMMIER, Y. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochemical Pharmacology**. v. 49(8) p. 1165-1170, 1995.

MIQUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J.M.; DÍAZ-ALPERI, J.; RAMÍREZ, A. The curcuma antioxidant: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 34, p. 37-46, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap. 22, p.417-454.

RAJA, J.; KURUCHEVE, V. Influence of plants extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**. v. 51(1), p.102-103, 1998.

REGENTE, M.C.; OLIVA, C.R.; FELDMAN, M.L.; CASTAGNARO, A.P.; CANAL, L. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 178-182, 1997.

RESENDE, M.L.V.; MACHADO, J.da C. **Manejo de doençaas em pós-colheita de produtos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANNI, G.R.; CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis perniciosa* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

RODRIGUES, E.D.V.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M. E.S.; BERNARDO, R., STANGARLIN, J.R. Potencial de *Zingiber officinale* (gengibre) no controle de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia brasileira** 24 (Suplemento):321, 1999.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A. STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SAJU, K.A.; VENUGOPAL, M.N.; MATHEW, M.J. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.) **Current Science**. v. 75(7), p. 660-662, 1998.

SANTOS, M.M.F.B. dos. Efeito de extratos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gleosporioides* (Penz.), isolado de *Citrus*. In: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORRÊA Jr.C.; BARROS, I.B.I.; MATOS, J.K. de A. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: UNESP [Apoio PROIN/CAPES], 1998. v. 1, p. 193-217.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 23-43, 2000.

SHUKLA, Y.; ARORA, A.; TANEJA, P. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. **Mutation Research**, v. 515, p. 197-202, 2002.

SILVA, L.H.C.P. da. **Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro**. Lavras, 2002. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras.

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, p. 75-81, 2002.

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

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

STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; KABWE, M.K.; HAUNG, Z.; ADEYEYE, O.; PUSEY, L. P.; TANG, A.Y.A. Induced resistance of sweetpotato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. **Crop Protection**, v. 18, p. 463-470, 1999.

SURH, Y-J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1091-1097, 2002

UECHI, S.; MIYAGI, Y.; ISHIMINE, Y.; HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**. v. 44(2), p. 138-140, 2000.

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

VICENTE, M.C.M.; CAMPBELL, A.; BAPTISTELLA, C.S.L.; COELHO, P.J.; LOPES JÚNIOR, A.. O uso de agrotóxicos em culturas selecionadas da agricultura paulista. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.5, p.34-44, 2002.

VIGO, S.C. **Controle de *Microsphaeria diffusa* (oídio da soja) pelo uso de tintura vegetal da planta medicinal *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro).** Marechal Cândido Rondon, 2002. 29 p. Monografia (Curso de Agronomia). Universidade Estadual do Oeste de Paraná.

WALLING, L. Induced resistance: from the basic to the applied. **Trends in Plant Sciences,** v. 6, n.10, oct. 2001.

APÊNDICE

Quadro 1. Temperatura e umidade relativa máximas, mínimas e médias semanais registradas no ensaio *in vivo* 1 na área de cultivo protegido entre maio e setembro de 2004.

MÊS	SEMANA	Temperatura (ºC)			Umidade relativa (%)		
		Máx.[1]	Mín.[2]	Média[3]	Máx.[1]	Mín.[2]	Média[3]
Maio	1ª	26,9	16,7	21,8	78,3	69,8	74,1
	2ª	30,3	13,3	21,8	78,7	66,3	72,5
	3ª	30,2	8,9	19,6	74,8	59,3	67,1
	4ª	24,2	12,1	18,2	82,4	72,1	77,3
Junho	1ª	28,6	13,3	21,0	76,6	64,0	70,3
	2ª	26,3	7,3	16,8	76,8	61,6	69,2
	3ª	32,5	12,9	22,7	65,8	49,3	57,6
	4ª	28,2	16,5	22,4	75,4	65,0	70,2
Julho	1ª	28,9	16,3	22,6	77,1	67,6	72,4
	2ª	23,7	12,1	17,9	82,4	64,1	73,3
	3ª	21,7	13,6	17,7	84,7	71,8	78,3
	4ª	24,1	9,8	17,0	66,1	46,6	56,4
Agosto	1ª	22,2	12,8	17,5	57,4	50,0	53,7
	2ª	18,5	15,0	16,8	51,5	45,5	48,5
	3ª	30,0	15,0	22,5	48,0	30,2	39,1
	4ª	26,8	13,1	20,0	53,2	40,4	46,8
Setembro	1ª	33,8	16,8	25,3	47,3	30,0	53,7
	2ª	33,1	14,9	24,0	41,3	31,7	48,5
	3ª	32,2	17,3	24,8	42,0	37,0	39,1

[1]Média semanal dos valores máximos de temperatura ou umidade relativa;
[2]Média semanal dos valores mínimos de temperarura ou umidade relativa;
[3]Média calculada como: (valor máximo + valor mínimo) / 2