UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
***CAMPUS* DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL DOUTORADO

HELOÍSA MARIA FORMENTINI

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA BIÓTICO, ABIÓTICO E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PR
AGOSTO/2012

HELOÍSA MARIA FORMENTINI

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA BIÓTICO, ABIÓTICO E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para obtenção do título de doutora em Agronomia. Área de concentração: Produção Vegetal.
Professor: Dr. José Renato Stangarlin.

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PR

AGOSTO/2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

Formentini, Heloísa Maria
F725a Avaliação de indutores de resistência biótico, abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro / Heloísa Maria Formentini. – Marechal Cândido Rondon, 2012.
90 p.

Orientador: Dr. José Renato Stangarlin

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012.

1. Tomate – Controle biológico. 2. Tomate – Indução de resistência. Tomate - Cultivo. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 635.642
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

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

Ata da reunião da Comissão Julgadora da defesa de Tese da Engenheira Agrônoma **HELOÍSA MARIA FORMENTINI**. Aos trinta e um dias do mês de agosto de 2012, às 14h00min, sob a presidência do Prof. Dr. José Renato Stangarlin em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Tese da Engenheira Agrônoma Heloísa Maria Formentini, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Gilmar Franzener (UFFS), Prof. Dr. Odair José Kuhn, Prof.ª Dr.ª Adriana Terumi Itako (UFSC), Prof.ª Dr.ª Gláucia Cristina Moreira e Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Tese, intitulada: **"AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA BIÓTICO, ABIÓTICO E EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO".**

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Gilmar Franzener.....Aprovada
Prof. Dr. Odair José Kuhn .....Aprovada
Prof.ª Dr.ª Adriana Terumi Itako.....Aprovada
Prof.ª Dr.ª Gláucia Cristina Moreira.....Aprovada
Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 31 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Gilmar Franzener

Prof. Dr. Odair José Kuhn

Prof.ª Dr.ª Adriana Terumi Itako

Prof.ª Dr.ª Gláucia Cristina Moreira

Prof. Dr. José Renato Stangarlin (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço a minha família, meus pais Irineu Formentini e Satika Formentini, a minha irmã Pierina K. I. Formentini e Suenon Furtado Pereira pelo amor, paciência, alegrias, apoio, compreensão, ajuda e incentivo que me dedicaram a todo o momento.

Ao meu orientado prof. Dr. José Renato Stangarlin pela oportunidade, ensinamentos, paciência e ajuda para conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Odair José Kuhn pelos ensinamentos e auxílio na metodologia das análises bioquímicas.

À Marta Inês Ferreira da Cruz e Cristiane Claudia Meinerz que estiveram presentes constantemente e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade.

A todos os amigos e colegas do grupo de pesquisa Controles Biológico e Alternativo em Fitossanidade – COBALFI.

A todos os professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pela concessão de bolsa auxílio, e,

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Avaliação de indutores de resistência biótico, abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro

No Brasil o tomate é uma das espécies de hortaliças de grande importância tanto no ponto de vista econômico quanto social, no entanto vários fatores são limitantes para sua produção como exemplo as doenças causadas por fitonematoides principalmente as espécies do gênero *Meloidogyne* que inviabilizam a produção nas áreas infestadas. Buscando novas medidas de proteção e controle de doenças de plantas a indução de resistência é uma alternativa haja vista que pouca atenção tem sido direcionada a possibilidade de indução de resistência à patógenos do sistema radicular como os fitonematoides. Assim este trabalho teve como objetivo verificar a eficácia do indutor químico acibenzolar-S-metil, do indutor biótico *Bacillus cereus* e de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cúrcuma (*Curcuma longa*) na indução de resistência em tomateiros suscetível e resistente infectados com *Meloidogyne incognita* raça 3. Foram conduzidos dois experimentos simultaneamente ambos seguiram o esquema fatorial 2 x 6 com dois genótipos de tomateiro um suscetível à *M. incognita* (Santa Clara) e um resistente (Ivety) e seis tratamentos: ASM (125 mg i.a L^{-1}), *Bacillus cereus* (6.10^7 UFC mL^{-1}), alecrim 10%, cúrcuma 10%, água e uma testemunha absoluta (sem inóculo e sem pulverização na parte aérea), com cinco repetições. Cada vaso, com capacidade para 2 L, foram preenchidos com a mistura de solo, areia e composto orgânico previamente autoclavados e homogeneizados na proporção 2:2:1 e para cada vaso foram transplantados três mudas de tomateiro suscetível e resistente. Os tratamentos foram pulverizados na parte aérea dos tomateiros em todos os vasos com exceção da testemunha absoluta. Às 72 h após a primeira aplicação dos tratamentos foi realizada a inoculação de 407/100 cm^3 de J2 e ovos por vaso. No primeiro experimento, utilizando amostras destrutivas de tomateiros tratados e inoculados com *M. incognita* foram determinadas a resposta dos dois genótipos aos tratamentos aplicados para a atividade enzimática das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, quitinase, β-1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase a partir do macerado homogeneizado das raízes dos tomateiros para o tempo de coleta 0 h, 24 h, 48 h, 96 h e 120 h após a aplicação dos tratamentos. No segundo experimento, as variáveis analisadas para determinar o efeito dos tratamentos sobre a população do nematoide foram o número de galhas, juvenis e ovos presentes no solo realizado aos 56 dias após a primeira aplicação dos tratamentos que foram reaplicados a cada sete dias durante este período. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que houve uma redução no número de galhas no sistema radicular dos tomateiros não apresentando diferença entre os dois genótipos para as plantas que receberam os tratamentos com acibenzolar-S-metil, cúrcuma, alecrim e *Bacillus cereus*. Houve uma redução na formação de galhas na cultivar suscetível, confirmando seu potencial na proteção dos genótipos utilizados contra o ataque do *M. incognita*. Para a atividade enzimática a peroxidase foi a enzima que esteve fortemente associada à resistência com a atividade superior no genótipo resistente em relação ao suscetível independentemente do tratamento indutor. No tomateiro suscetível o *B. cereus* destacou-se na indução de peroxidase e quitinase enquanto que para o tomateiro resistente o alecrim induziu peroxidase e polifenoloxidase e os extratos de alecrim e cúrcuma induziram a enzima quitinase para o genótipo suscetível.

Palavras-chave: *Curcuma longa*, *Rosmarinus officinalis*, *Bacillus cereus*, acibenzolar-S-metil, peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinase, β-1,3-glucanase, controle biológico, indução de resistência, *Solanum lycopersicum* L.

ABSTRACT

Evaluation of resistance inductors biotic, abiotic and plant extracts for the control of *Meloidogyne incognita* on tomato plants

In Brazil, the tomato is one of the vegetable species of great importance both economically and socially, however several factors are limiting its production as an example the diseases caused by nematodes of the genus *Meloidogyne* that limit the production in infested areas. Seeking new measures of protection and control of plant disease induced resistance is an alternative considerering that little attention has been directed to the possibility of induced resistance to root pathogens like nematodes. Therefore, this study aimed to verify the effectiveness of the chemical inducer acibenzolar-S-methyl, the biotic inductor *Bacillus cereus* and plant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*) in the induced resistance in susceptible and resistant tomato in plants infected with *Meloidogyne incognita* race 3. Two experiments were conducted simultaneously both followed the 2 x 6 factorial design with two tomato genotypes, one susceptible to *M. incognita* (Santa Clara) and a resistant (Ivety) and six treatments: ASM (125 mg i.a L^{-1}), *Bacillus cereus* (6.10^7 CFU mL^{-1}), rosemary 10%, turmeric 10%, water and a control (no inoculum and no spraying in the aerial part), with five replicates. Each vase with a capacity of 2 L, were filled with a mixture of soil, sand and compost previously autoclaved and homogenized in the ratio 2:2:1 and were transplanted to each one three tomato seedlings susceptible and resistant. The treatments were sprayed in the aerial part in tomato plants in all vases except the absolute control. At 72 h after the first application of treatments was carried out the inoculation of 407/100 cm^3 of J2 and eggs per vase. In the first experiment, using destructive samples of tomato treated and inoculated with *M. incognita* were determined the response of both genotypes to the treatments applied to the enzymatic activity of peroxidase, polyphenol oxidase, chitinase, β-1,3 glucanase and phenylalanine ammonia-lyase from roots of tomato plants that were macerated and homogenized to withdrawals in time 0 h, 24 h, 48 h, 96 h and 120 h after the first application of the treatments. In the second experiment, the variables analyzed to determine the effect of treatments on nematode population were the number of root-knots, juveniles and eggs in the soil accomplished at 56 days after the first application of the treatments that were reapplied every seven days during this period. From the results obtained it was concluded that there was a reduction in the number of root-knots in the roots of tomato plants showing no difference between the two genotypes for plants that received the treatments with acibenzolar-S-methyl, turmeric, rosemary and *B. cereus*. There was a reduction in the formation of root-knots in susceptible cultivar, confirming their potential in protecting the genotypes used against the attack of *M. incognita*. For the enzimatic activity peroxidase was the enzyme strongly associated with resistance with the highest activity in resistant genotype if compared to susceptible regardless of inducer treatment. In susceptible tomato *B. cereus* stood out in the induction of chitinase and peroxidase whereas for the resistant tomato rosemary induced peroxidase and polyphenol oxidase and rosemary extracts and turmeric induced chitinase enzyme to the susceptible genotype.

Keywords: *Curcuma longa*, *Rosmarinus officinalis*, *Bacillus cereus*, acibenzolar-S-methyl, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, poliphenoloxidases, β-1,3-glucanase, chitinase, biological control, induction of resistance, *Solanum lycopersicum* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Corte da região perineal de *Meloidogyne incognita* 45

Figura 2 – Identificação pelo fenótipo da isoenzima esterase. *Meloidogyne incognita* (I1) e *Meloidogyne javanica* (J3).....45

Figura 3 – Distribuição espacial dos tratamentos correspondentes ao experimento 1 e 2 para genótipo resistente e suscetível: (T-) testemunha absoluta (não tratada e não inoculada), (T+) tratamento controle com água destilada, (B.C.) tratamento com *B. cereus*, (Al.) tratamento com alecrim, (Cur.) tratamento com cúrcuma e (ASM) tratamento com acibenzolar-S-metil. 47

Figura 4 – Média do número de galhas presentes no sistema radicular de tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis à *Meloidogyne incognita* e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). 54

Figura 5 – Média do número de ovos de *Meloidogyne incognita* em 100 cm^3 de solo coletado em vasos contendo tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). 56

Figura 6 - Média do número de J2 de *Meloidogyne incognita* em 100 cm^3 de solo coletado em vasos contendo tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). 58

Figura 7 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática na interação das médias dos genótipos resistentes e suscetíveis de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* dentro de cada tratamento para as atividades radiculares de peroxidase (A), polifenoloxidase (B) e β-1,3 glucanase (C). Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 5,03; 1,10 e 2,52, respectivamente. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$.....62

Figura 8 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática para as médias das atividades radiculares de peroxidase (A), polifenoloxidase (B) e β-1,3 glucanase (C) para cada um dos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro resistente à *Meloidogyne incognita*. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 5,03; 1,10 e 2,52, respectivamente. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$.....64

Figura 9 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática para as médias da atividade radicular de polifenoloxidase para cada um dos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro suscetível à *Meloidogyne incognita*. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 1,10. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$. 65

Figura 10 – Atividade radicular de peroxidase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiros suscetível (A) e resistente (B) inoculados com *Meloidogyne incognita*. indica a aplicação dos tratamentos no tempo de coleta 0 hora e indica a inoculação de *M. incognita* após 72 horas. * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey. 67

Figura 11 – Atividade radicular de polifenoloxidase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiros suscetível (A) e resistente (B) que foram inoculados com *Meloidogyne incognita*. indica a aplicação dos tratamentos no tempo de coleta 0 hora e indica a inoculação de *M. incognita* após 72 horas. * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey. 69

Figura 12 – Atividade radicular de quitinase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro suscetível que foi inoculado com *Meloidogyne incognita* 72 horas após a aplicação dos tratamentos que foram realizados no tempo de coleta 0 hora . * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey. 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9

1.1 Objetivos Gerais 10
1.1.1 Objetivos específicos 10

2 REVISÃO DE LITERATURA 11

2.1 A Cultura Do Tomate 11
2.1.1 Características gerais do tomateiro 11
2.1.2 Importância econômica da cultura 12

2.2 Nematoides 13
2.2.1 Características gerais 13
2.2.2 Gênero *Meloidogyn*e Göldi, 1892 14
2.2.2.1 Sintomas causados por *Meloidogyne* spp. 16
2.2.2.2 Aspecto biológico do gênero *Meloidogyne* 17
2.2.2.3 *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood 24

2.3 Mecanismos De Resistência Nas Plantas 25
2.3.1 Proteínas relacionadas à patogênese 30
2.3.1.1 Peroxidases 31
2.3.1.2 β-1,3-glucanases 32
2.3.1.3 Quitinases 33
2.3.2 Outras enzimas associadas ao processo de defesa 33
2.3.2.1 Fenilalanina amônia-liase 33
2.3.2.2 Polifenoloxidases 34

2.4 Indução De Resistência 35
2.4.1 Indutores abióticos 37
2.4.1.1 Acibenzolar-S-metil 38
2.4.2 Indutores bióticos 39
2.4.2.1 *Bacillus cereus* 39

2.4.3 Indutores de origem biótica 40
2.4.3.1 Alecrim 42
2.4.3.2 Cúrcuma 43

3 MATERIAL E MÉTODOS 44

3.1 Localização Do Experimento 44

3.2 Cultivo Do Tomate 44
3.3 Obtenção E Identificação De *Meloidogyne incognita* 44
3.3.1 Extração e quantificação de *M. incognita* 46

3.4 Efeito Dos Indutores De Resistência Em Tomateiros Infectados Por *Meloidogyne incognita* 46
3.4.1 Preparo dos extratos vegetais e indutores biótico e abiótico 48

3.4.2 Avaliação do sistema radicular dos tomateiros 48
3.4.3 Determinação da população de *M. incognita* presentes no solo 49
3.4.4 Determinação da atividade de enzimas relacionadas à defesa 49
3.4.4.1 Obtenção da preparação enzimática 49
3.4.4.2 Atividade de peroxidases 49
3.4.4.3 Atividade de polifenoloxidase 50
3.4.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase 50
3.4.4.5 Atividade de β-1,3-glucanase 51
3.4.4.6 Atividade de quitinases 51
3.4.4.7 Determinação de proteínas totais 52
3.4.5 Análise dos resultados 52

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53

4.1 Efeitos Dos Tratamentos No Controle De *M. incognita* Em Genótipos Resistente E Suscetível De Tomateiro 53
4.1.1 Efeito dos tratamentos no número de galhas presentes no sistema radicular 53
4.1.2 Efeito dos tratamentos no número de ovos e juvenis de segundo estádio 55

4.2 Enzimas Relacionadas À Defesa 61
4.2.1 Relação entre genótipo resistente e suscetível de tomateiros e os tratamentos para a atividade radicular das enzimas relacionadas à defesa 61
4.2.2 Dinâmica da atividade enzimática 66
4.2.2.1 Atividade de peroxidase 66
4.2.2.2 Atividade de polifenoloxidase 68
4.2.2.3 Atividade de quitinase 70

5 CONCLUSÕES 72

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (sin.: *Licopersicon esculentum* Mill.) é uma das culturas mais comuns do mundo, considerado de importância comercial para pequenos agricultores e agricultores comerciais de média escala (NAIKA et al., 2006).

No Brasil é uma das espécies de hortaliças de grande importância tanto do ponto de vista econômico quanto social, pelo volume de produção e pela geração de empregos (MAKISHIMA e MELO, 2005).

Vários fatores são limitantes para a produção de tomate no Brasil, destacando as doenças de natureza biótica como os principais. As doenças causadas por fitonematoides têm ocasionado uma redução drástica da produção, prejuízo provocado principalmente pela incidência de *Meloidogyne* spp. nas áreas de cultivo, inviabilizando a produção nas áreas infestadas. Com o advento da agricultura orgânica no mundo e inclusive no Brasil é necessário buscar alternativas viáveis e eficazes para seu controle.

As principais espécies do gênero *Meloidogyne* que atacam o tomateiro são *Meloidogyne javanica* (Treub) e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (CAMPOS, 1999).

Os principais métodos de controle recomendados para estes fitonematoides são o uso de nematicidas, rotação de culturas e utilização de variedades resistentes. Os nematicidas, além de onerosos, causam danos ao meio ambiente, são prejudiciais à saúde humana e aos organismos existentes no solo. A utilização de variedades resistentes aliado à rotação de culturas é recomendada.

Buscando-se novas medidas de proteção e controle de doenças de plantas que não ocasionem efeitos negativos para o meio ambiente e o homem, o controle alternativo de doenças de plantas é interessante, no qual se incluem o controle biológico e a indução de resistência, que busca ativar os mecanismos de defesa vegetal por meio da aplicação de algum agente indutor.

A maioria dos trabalhos de indução de resistência relaciona-se comumente às doenças foliares. Pouca atenção tem sido direcionada a possibilidade de indução de resistência a patógenos do sistema radicular como os fitonematoides.

Contudo, alguns trabalhos têm comprovado o aumento da resistência de plantas a nematoides em diferentes patossistemas com a aplicação de indutores químicos. Desta forma,

os ativadores de resistência podem se constituir em uma opção de manejo para os fitonematoides.

1.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficácia de um indutor abiótico (acibenzolar-S-metil), de um indutor biótico (*Bacillus cereus*) e de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cúrcuma (*Curcuma longa*) na indução de resistência em tomateiros suscetível e resistente infectados com *Meloidogyne incognita* raça 3.

1.1.1 Objetivos específicos

- Verificar a eficácia dos tratamentos aplicados no genótipo resistente e suscetível de tomateiro para o controle de *M. incognita* através da quantificação do número de juvenis de segundo estádio e ovos presentes nas amostragens de solo e a contagem do número de galhas presentes no sistema radicular;

- Determinação da resposta dos genótipos aos tratamentos aplicados para a atividade enzimática das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, quitinase, β-1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura Do Tomate

2.1.1 Características gerais do tomateiro

Segundo Jones (2008) o tomate pertence ao gênero *Solanum*, família *Solanaceae*, e apresenta a seguinte classificação científica:

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionia
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Asteridae
Ordem: Solanales
Família: Solaneceae
Gênero: *Solanum*
Espécie: *Solanum lycopersicum* L.

O tomateiro é uma planta herbácea, desenvolve-se geralmente em regiões de clima temperado. Quanto ao hábito de crescimento os tomates cultivados são divididos em dois tipos: indeterminado e determinado. Em cultivares de crescimento determinado geralmente o amadurecimento dos frutos ocorre mais cedo que os tomateiros que possuem o hábito de crescimento indeterminado. A planta produz continuamente três nós; entre cada inflorescência, embora que algumas variedades melhoradas podem apresentar menos de três nós, possui um caule que termina em uma inflorescência e a colheita de seus frutos pode ser realizada de forma manual ou mecanizada (JONES, 2008).

A maioria dos tomates cultivados são híbridos, resultado do melhoramento e desenvolvimento de algumas plantas com características de resistência ao estresse, ataque de alguns insetos pragas e doenças e também quanto a qualidade dos frutos como tamanho, forma, cor, firmeza e tempo de vida na prateleira (ATHERTON e RUDICH, 1986).

O tomateiro freqüentemente é utilizado como uma planta teste para estudos fisiológicos, porque é relativamente de fácil crescimento e possui de moderada a alta exigência por nutrientes (JONES, 2008).

2.1.2 Importância econômica da cultura

Segundo JONES (2008) a história do tomate é contada em dois continentes: na América (Sul e Norte) e na Europa.

Acredita-se que o tomate cultivado é proveniente do tomate cereja *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*, que é selvagem no Peru, Equador e em algumas regiões da américa tropical. Provavelmente foi domesticada pela primeira vez no México e na metade do século 16 foi introduzida na Europa pelos espanhóis (PRANCE e NESBITT, 2005), pois as primeiras sementes foram trazidas por Hernando Cortez do México após tomar a Cidade do México em 1519 (JONES, 2008). Mais tarde foi disseminada da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio.

Mundialmente é a segunda solanácea mais cultivada sendo a China o maior produtor seguido pelos Estados Unidos e Índia. O Brasil é o maior produtor da América Latina e ocupa o nono lugar dos países produtores de tomate no mundo (FAO, 2010).

A produção média nacional é de 3,7 milhões de toneladas com um rendimento médio de 62.470 Kg ha^{-1}, com o valor de produção (produtor) nacional de 2.614,3 milhões de reais e uma mão de obra de 280,5 milhões de reais (FAO, 2010; IBGE, 2011).

A região Sul do Brasil possui uma área cultivada de 11.000 ha com produção de 659.030 t e um rendimento médio de 59.912 Kg ha^{-1}. O Estado do Paraná possui uma área cultivada de 5.928 ha, produção de 373.509 t e um rendimento médio de 63.008 Kg ha^{-1} (IBGE, 2011).

O tomateiro é considerado uma cultura de elevado risco econômico (LUZ et al., 2007) exigindo diversos tratos culturais, pois o investimento com fertilizantes, agroquímicos e sementes para sua produção em escala nacional é de 283,3; 293,7 e 96,2 milhões de reais, respectivamente (IBGE, 2011), além de ser suscetível a pragas e doenças.

Segundo Jones (2008) a produção comercial de tomates nas regiões tropicais tem como desafio a obtenção de variedades que podem resistir a temperaturas elevadas, doenças e a pressão exercida pelos insetos pragas da cultura.

Objetivando a produção de alimentos saudáveis e que o manejo para produção cause menor impacto ambiental com menor custo de produção, a agricultura orgânica é uma alternativa para os agricultores.

Na agricultura orgânica a redução do ataque de organismos prejudiciais ao desenvolvimento da planta é realizada através do uso de receitas caseiras, preparadas a base de extratos naturais pouco ou nada agressivos ao meio ambiente (SOUZA, 1998).

Entretanto, a cultura do tomateiro é hospedeira de diversas espécies de nematoides. O nível de dano provocado pelos nematoides varia conforme a espécie e suscetibilidade da planta. Na busca de alternativas para o controle de fitonematoides nematicidas naturais têm sido procurados pelos pesquisadores para substituir as moléculas químicas utilizadas.

2.2 Nematoides

2.2.1 Características gerais

Os nematoides são invertebrados, pseudocelomados e pertencentes ao reino Animal (Animalia) filo Nemata ou Nematoda. Podem ser encontrados na água, no solo, matéria orgânica em decomposição, de vida livre ou parasitando animais e plantas (DECREAMER e HUNT, 2006). São comumente encontrados na região da rizosfera da planta, mas algumas espécies podem parasitar outras partes da planta como folhas ou sementes (FERRAZ et al., 2010), e segundo Hussey et al. (1994) são os parasitas mais bem sucedidos da natureza devido a sua complexidade aparente, pelo desenvolvimento de um elaborado sítio de alimentação dentro das raízes das plantas hospedeiras considerado o mais avançado evolutivamente.

Dos nematoides que se tem conhecimento, 99% das espécies têm um corpo longo, fino e com a forma cilíndrica, sua cauda pode ser curta ou longa diferindo de acordo com seu estágio de desenvolvimento e o sexo. O corpo apresenta uma simetria bilateral, a parte anterior e posterior possui uma simetria radial. A parede do corpo é constituída por uma cutícula, epiderme e uma musculatura somática. Externamente, o corpo mostra pequena diferenciação entre as seções, mas pode ser dividido em dorsal, ventral e duas seções laterais (DECREAMER e HUNT, 2006).

Os nematoides parasitas de plantas apresentam a região labial achatada e indivisa e como principal característica, a presença do estilete, que auxilia no parasitismo das plantas, cujo comprimento pode variar de 10 a 25 µm (KARSSEN e MOENS, 2006).

Há dois tipos de estiletes, o odontoestilete (estrutura caniculada com a extremidade anterior cortada em bisel), e o estomatoestilete (constituído por três partes a anterior cônica, uma haste e uma porção basal) (FERRAZ e MONTEIRO, 2011). Quanto ao tamanho de seu corpo pode apresentar um comprimento variável de 300 a 1.000 µm (alguns podem atingir até quatro milímetros) e uma espessura que pode variar entre 15 a 35 µm (AGRIOS, 2005).

Algumas espécies de nematoides são micrófagos, alimentando-se de pequenos microrganismos, enquanto outros são saprófagos nutrindo-se da matéria orgânica. Muitas espécies de nematoides são fitófagos e alimentam-se diretamente das plantas, enquanto que outros são onívoros ou predadores. Considerando os diversos tipos de parasitismo existentes os nematoides podem ser: (a) ectoparasitas, (b) endoparasitas e (c) semi-endoparasitas. Os nematoides ectoparasitas são de vida livre, vivem no solo e não penetram o tecido da planta, alimentam-se usando o estilete para furar as células da mesma. Os endoparasitas para se alimentar penetram no tecido da raiz, como exemplo tem-se os endoparasitas migradores como o *Pratylenchus* e *Radopholus* que não possuem um sítio de alimentação fixo migrando no tecido da planta. Já os endoparasitas sedentários também possuem uma fase em que são migradores, mas isto ocorre antes de estabelecerem o sítio de alimentação como acontece com os nematoides do cisto e de galhas cuja fase de juvenil de segundo estágio (J2) e o macho são migradores. Nos semi-endoparasitas somente a parte anterior do nematoide penetra a raiz e a parte posterior fica no solo (DECREAMER e HUNT, 2006).

Os grupos de nematoides de interesse agronômico pertencem à classe Chromadorea, concentrando-se especialmente na ordem Rhabditida, subordem Tylenchina (FERRAZ e MONTEIRO, 2011) como, por exemplo, os nematoides do gênero *Meloidogyne*.

2.2.2 Gênero *Meloidogyn*e Göldi, 1892

O primeiro relato sobre os nematoides de galhas foi realizado por Miles Joseph Berkeley em 1855 em pepino. Após a sua descoberta, somente em 1887 o gênero foi nomeado pelo sueco Émil August Göldi como *Meloidogyne*, sendo proposto e descrito quando encontrou galhas em raízes de cafeeiro no estado do Rio de Janeiro no Brasil, identificando-as

como *Meloidogyne exigua* Göldi. Desde então na literatura a data da publicação da descrição de Göldi varia entre os anos de 1887 ou 1892 (HUNT e HANDOO, 2009).

Os nematoides de galhas pertencem ao gênero *Meloidogyn*e (Göldi, 1892), palavra do do grego que significa 'fêmea em forma de maçã'. São polífagos, parasitas obrigatórios e de grande importância econômica. Alimentam-se modificando as células das plantas dentro das raízes as quais são induzidas, causando hipertrofia e hiperplasia formando as células gigantes e originando as galhas (MOENS et al., 2009).

Segundo Decreamer e Hunt (2006) baseado em De Ley e Blaxter (2002), os nematoides formadores de galhas pertencem ao Reino Animal, Filo Nematoda Potts, 1932; Classe Chromadorea Inglis, 1983; Subclasse Chromadoria Pearse, 1942; Ordem Rhabditida Chitwood, 1933; Subordem Tylenchina Thorne, 1949; Infraorder Tylenchomorpha De Ley e Blaxter, 2002; Superfamília Tylenchoidea Örley, 1880; Família Meloidogynidae Skarbilovich, 1959; Subfamília Meloidogyninae Skarbilovich, 1959; Gênero *Meloidogyne* Göldi, 1892.

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são endoparasitas e possuem um alto grau de polifagia (KARSSEN e MOENS, 2006). Até o final de 2004, 106 espécies do gênero *Meloidogyne* haviam sido descritas, sendo 89 espécies tidas como válidas (PERRY e MOENS, 2006). Quatro espécies são consideradas as mais importantes devido a sua ampla distribuição geográfica: *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 e *M. hapla* Chitwood, 1949 (FERRAZ e MONTEIRO, 2011). As mais freqüentes no Brasil são *M. incognita* e *M. javanica*, amplamente disseminadas e, portanto, as de maior importância econômica (CAMPOS, 1985).

Devido à grande quantidade de espécies de *Meloidogyne* descritas em todo mundo é necessário que seja realizado a identificação da espécie para definir o melhor método de controle. É utilizada freqüentemente a identificação das espécies do gênero *Meloidogyne* pelas características morfológicas como: a configuração da região perineal, que compreende a região do ânus e da vulva, terminação da cauda, fasmídeos, linhas laterais e as estrias na cutícula. Outros métodos de identificação também são utilizados como: a identificação pelo fenótipo isoenzimático da enzima esterase e malato-desidrogenase e por diagnósticos moleculares pelas metodologias baseadas na reação em cadeia de polimerase (PCR) (HUNT e HANDOO, 2009). Atualmente, tem sido utilizado o método integrado das análises para identificação (FERRAZ e MONTEIRO, 2011).

2.2.2.1 Sintomas causados por *Meloidogyne* spp.

Os sintomas causados pelo nematoide são aparentemente semelhantes aos sintomas produzidos em qualquer planta pelo mau funcionamento e danos do sistema radicular. A infecção pelo *Meloidogyne* afeta a absorção de água e nutrientes e a translocação pelo sistema radicular. É importante enfatizar que as condições ambientais favoráveis auxiliam o patógeno no seu desenvolvimento, colonização, reprodução e dispersão (PERRY et al., 2009).

O impacto causado pelo nematoide de galhas na planta hospedeira é característico. Observando a parte da planta localizada acima do solo os sintomas são gerais e não específicos, semelhantes a uma planta com deficiência mineral. O crescimento é reduzido, as plantas ficam raquíticas, ocorre abscisão foliar prematura, murcha, senescência precoce, redução na produção e perda de rendimento. Estas são as consequências dos danos na raiz devido à interferência na síntese e translocação de hormônios de crescimento da planta hospedeira, como as citocininas e as giberelinas, diminuindo a fotossíntese. Enquanto isso, no sistema radicular observa-se a presença de galhas que se desenvolvem em resposta aos reguladores de crescimento, proteínas e glicoproteínas produzidas pela glândula esofagiana subventral do J2 introduzidas na hospedeira pelo estilete do nematoide (BIRD, 1974; JEPSON, 1987).

A modificação na raiz depende da planta hospedeira e da espécie do nematoide envolvido, pois poucas espécies do gênero *Meloidogyne* produzem galhas grandes como *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*. Espécies como *M. graminis* (Sledge e Golden, 1964) Whitehead, 1968 e *M. oryzae* (Maas, Sanders e Dede, 1978) produzem galhas discretas e outras não formam galhas como *M. aquatilis* (Ebsary e Eveleigh, 1983) (JEPSON, 1987) e *M. coffeicola* (Lordello e Zamith, 1960) Kir'yanova, 1963 no cafeeiro arábico, cujo sintoma típico é o descolamento cortical onde uma porção do córtex fica desorganizada e se destaca facilmente do restante da raiz. Assim, a presença de galhas no sistema radicular não constitui um sintoma obrigatório, podendo estar ausente em determinadas interações (FERRAZ E MONTEIRO, 2011).

A extensão das galhas está relacionada com as espécies, a posição da fêmea dentro da galha e o modo de reprodução. O tamanho da galha em determinada espécie do gênero *Meloidogyne* depende da planta hospedeira envolvida (MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2004).

Outros sintomas que também podem ser observados são: redução do volume do sistema radicular, descolamento cortical, raízes digitadas e rachaduras, entre outros (FERRAZ e MONTEIRO, 2011).

2.2.2.2 Aspecto biológico do gênero *Meloidogyne*

O macho e a fêmea do nematoide de galhas são distintos morfologicamente. Os machos apresentam aproximadamente 1,2 a 1,5 mm de comprimento e 30 a 36 µm de diâmetro. As fêmeas têm formato de pêra e possuem aproximadamente 0,40 a 1,30 mm de comprimento e 0,27 a 0,75 mm de largura (AGRIOS, 2005). O comprimento do estilete da fêmea variando entre 15 a 16 µm enquanto que do macho pode apresentar um comprimento médio de 24,5 µm (KARSSEN e MOENS, 2006).

Estes nematoides produzem secreções que tem um papel importante na formação das células nutridoras no local da infecção na planta (WILLIAMSON e GLEASON, 2003). Eles possuem diversas estruturas responsáveis pela sua interação com a planta hospedeira como os órgãos secretores, os anfídios (que são quimioreceptores cefálicos e cada anfídio é constituído por 12 neurônios com dendritos ciliados), as sensilas (localizadas na região cefálica do nematoide), os fasmídeos (quimioreceptores caudais), as glândulas esofagianas, o sistema excretor e o reto, que produzem a matriz gelatinosa que protege os ovos dos predadores e da desidratação. Além disso, na superfície da cutícula, que regula o fluxo dos fluídos na parede do corpo, são encontrados carboidratos que auxiliam no aumento da percepção de um sinal químico que atrai o nematoide para a planta hospedeira (EISENBACK, 1985). Principalmente exsudatos radiculares podem influenciar na eclosão de algumas espécies de *Meloidogyne* (CURTIS et al., 2009).

Durante a fase migratória do parasitismo as glândulas subventral estão preenchidas com vesículas, sendo estas importantes no estágio inicial do parasitismo, enquanto que a glândula dorsal ativa a produção de secreção após a sedentarização para desenvolver e manter os sítios de alimentação. Quando o nematoide começa a se alimentar as glândulas subventral ficam menos ativas. Portanto, as glândulas subventral e dorsal tem papéis diferentes durante o parasitismo (JAUBERT et al., 2002).

Após selecionar a célula da planta hospedeira, o nematoide perfura cuidadosamente a parede celular por ação mecânica do estilete e injeta secreções contendo enzimas hidrolíticas produzidas pelas glândulas esofagianas que desencadeiam uma série de respostas celulares e moleculares no receptor como a hipertrofia celular, dando origem mais tarde às galhas que são produzidas pela própria planta, como reação às toxinas introduzidas pelo nematoide. As mudanças nas estruturas celulares induzidas pelo nematoide nos sítios de alimentação são resultados da reprogramação da transcrição de genes da célula hospedeira (DAVIS et al., 2000; GHEYSEN e FENOLL, 2002; FERRAZ e MONTEIRO, 2011).

No ciclo de vida do nematoide de galhas cada fêmea deposita de 30 a 40 ovos por dia, aproximadamente 500 ovos no total, em uma substância gelatinosa, composta de glicoproteínas, que geralmente são depositados na superfície das raízes, algumas vezes podem ocorrer dentro das galhas. Na embriogênese, a primeira ecdise ocorre dentro do ovo dando origem ao juvenil de segundo estádio (J2). O J2 emerge do ovo para o solo e este é o único estádio infectivo do nematoide (AGRIOS, 2005; KARSSEN e MOENS, 2006).

O ovo de *Meloidogyne* spp. é cilíndrico e composto por três camadas: externa de vitelina, a média composta por quitina e a interna por lipídio. A quitina tem sido encontrada somente na composição da casca do ovo dos nematoides. Em testes experimentais realizados com *M. javanica*, Bird e McClure (1976) estimaram que a casca do ovo de *Meloidogyne* possui 30% de quitina. Bird (1968) sugere que, em *M. javanica*, as enzimas produzidas nas glândulas da faringe dos J2 auxiliam na hidrólise e flexibilidade da casca do ovo, tornando-o permeável e, nesta condição, é possível utilizar compostos tóxicos, até mesmo extratos de plantas, que tenham um potencial como agente de controle.

Algumas fases desse ciclo são detalhadas a seguir:

a) Eclosão:

Perry et al. (1992) correlacionaram positivamente a eclosão de *M. incognita* com a atividade de lipase, proteinase, colagenase e atividade de quitinase nos fluidos da eclosão do nematoide. Estas enzimas desgastam as camadas do ovo resultando em uma maior flexibilidade antes da eclosão.

Algumas espécies de *Meloidogyne* dependem dos exsudatos radiculares para iniciar o processo de eclosão. *M. incognita*, *M. hapla* e *M. javanica* aumentam a taxa de eclosão quando estimuladas pelos exsudatos radiculares do hospedeiro (BRZESKI e HENDRICKS, 1971).

Os exsudatos radiculares fornecem a matéria-prima que alimenta a comunidade microbiana na rizosfera. Compostos químicos lançados na rizosfera estão envolvidos na interação planta-nematoide e podem estimular a eclosão dos ovos, atuar como repelentes ou inibidores e ainda alguns compostos podem ser tóxicos aos nematoides (ZHAO et al., 2000).

Aos exsudatos radiculares incluem compostos de baixa massa molecular, como compostos amino, fenólicos, ácidos orgânicos, carboidratos, flavonóides, enzimas, nucleotídeos, chalconas, ácidos graxos e esteróis, entre outros, e compostos de alta massa

molecular como mucilagens (polissacarídeos) e proteínas. Tais compostos podem influenciar a sobrevivência no rizoplano (CURTIS et al., 2009).

Alguns destes compostos presentes nos exsudatos possuem potencial alelopático, como os flavonóides e fenóis, que desempenham importante papel na defesa e resistência da planta contra pragas e doenças (NICHOLSON e HAMMERSCHIMIDT, 1992), e podem exercer efeito direto sobre a sobrevivência do nematoide ou agir como um repelente e inibidor da mobilidade dos J2 de *M. incognita* (MAHAJAN et al., 1992).

b) Pós-eclosão:

A eclosão do J2 acontece somente quando estiver completamente desenvolvido (CURTIS et al., 2009). Assim, quando o J2 eclode e deixa a massa de ovos, migra para as partes adjacentes da raiz e causa novas infecções. Os J2 podem sobreviver no solo em um estado quiescente por um longo período. Entretanto, durante este período, eles consomem suas reservas que estão armazenadas no intestino. Como o processo de infecção está relacionado com as reservas de alimento, sua capacidade para infectar será reduzida após longos períodos de permanência fora das raízes (KARSSEN e MOENS, 2006).

De acordo com Prot (1978) os J2 de *Meloidogyne* ao serem atraídos pelas raízes da planta hospedeira podem se deslocar verticalmente uma distância de 25 cm em 10 dias. Segundo Arens et al. (1981) os juvenis de diferentes espécies de *Meloidogyne* diferem na sua habilidade para localizar e invadir as raízes afirmando que os juvenis de *M. javanica* são mais agressivos e capazes de localizar e invadir as raízes de fumo mais rapidamente que *M. incognita* e *M. arenaria* e isto explica o porque que *M. javanica* causa mais danos no fumo que as últimas espécies.

Os J2 acumulam-se na região de alongamento da raiz, na região próxima da coifa e também nos locais onde já ocorreram penetrações por outros nematoides, visto que estas regiões são os principais locais de liberação dos exsudatos. Há pouca diferença na atratividade das raízes das plantas suscetíveis e das resistentes, no entanto, quando ambas estão presentes, as suscetíveis são a preferência (KARSSEN e MOENS, 2006).

Os J2 são atraídos para as raízes de sua hospedeira pelo envio de substâncias químicas, ou seja, substâncias solúveis lançadas pelas raízes das plantas, pela temperatura do solo e o gás carbônico (CO_2). Estes influenciam no movimento vertical do nematoide no solo, sendo que a concentração de CO_2 é atrativa quando em baixa concentração aos J2 de *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* (CURTIS et al., 2009). Segundo El-Sherif e Mai (1969) os

nematoides parasitas de plantas podem localizar as raízes das plantas pelas altas temperaturas oriundas da alta atividade metabólica da respiração ao redor das raízes afirmando também que na natureza tanto as plantas como os animais estão constantemente absorvendo e emitindo a radiação infravermelha e o nematoide percebendo as emissões desta radiação pelas plantas pode detectar facilmente suas raízes.

Segundo Wallace (1966) a temperatura ótima para a eclosão, movimentação e invasão da raiz dos J2 estão entre 20 a 30ºC estas condições ocorrem comumente durante o dia nos solos das regiões subtropicais e tropicais. Juntamente com estes fatores a umidade do solo, textura do solo influenciam na atividade física do nematóide no solo.

Alguns sais podem influenciar no movimento direcional do nematoide no solo, como exemplo *M. incognita* é repelido por diferentes tipos de sais. Em experimento realizado por Castro et al. (1990) verificou-se que K^+, NH^+_4, Cs^+, NO^-_3 e Cl^- são fortes repelentes de *M. incognita in vitro*. Le Saux e Quénéhervé (2002) notaram que sais de cálcio não afetam a orientação do J2 desta espécie, enquanto que sais de nitrato de amônio e outros compostos nitrogenados liberados por materiais em decomposição são fortes repelentes.

c) Início do Parasitismo:

Quando os J2 entram em contato com as raízes das plantas, penetram suas paredes rígidas por uma combinação de danos físicos, ação mecânica do estilete e químicos, pela injeção de enzimas celulíticas e pectolíticas. Após a penetração na raiz o J2 migra intracelularmente para o córtex na região de diferenciação celular. Depois de migrar o J2 torna-se séssil no tecido cortical da zona de diferenciação da raiz (KARSSEN e MOENS, 2006).

Gradualmente o J2 fica mais robusto com o corpo salsichóide e perde a mobilidade, tornando-se sedentário e alimentando-se das células em torno de sua cabeça através da inserção de seu estilete, secretando saliva nas células e estimulando o seu alargamento e liquefazendo parte do conteúdo celular, que é retirado pelo nematoide com seu estilete. O J2 em seguida, passa por uma segunda ecdise e origina o juvenil de terceiro estádio (J3) que passa por uma terceira ecdise formando o juvenil de quarto estádio (J4) ou pré-adulto, o qual pode ser distinguido em macho ou fêmea. Estes se submetem a uma quarta ecdise e os machos atingindo a fase adulta emergem da raiz, estes são de vida livre. Já as fêmeas continuam a crescer tanto em espessura como em comprimento tornando-se piriforme (AGRIOS, 2005).

Alguns fatores podem influenciar na diferenciação sexual favorecendo a formação de machos. Diversos relatos têm mostrado que a determinação do sexo nos nematoides de galhas é influenciada por alguns fatores como:

- Nutrição da planta hospedeira: sob condições ideais de nutrição os J2 desenvolvem-se em fêmeas. No entanto, condições que causam algum tipo de estresse na hospedeira, ou algum evento que limite a disponibilidade de recursos aos nematoides redirecionam o desenvolvimento de J2 para a formação de machos (SNYDER et al., 2006).
- Densidade de infecção: as densidades elevadas de infecção geralmente causam uma redução na taxa de desenvolvimento dos nematoides, pois criam condições de estresse alimentar e um ambiente adverso resultante das concentrações excessivas de resíduos ou subprodutos metabólicos (TRIANTAPHYLLOU, 1973).
- Inibidores ou reguladores de crescimento em plantas: a hidrazida maleica é um inibidor de crescimento que inibe a divisão celular na região meristemática, reduz a taxa respiratória, bloqueia a translocação de fotossintetizados das folhas para as raízes e afeta a saúde da planta em geral (HUANG, 1985). De acordo com resultados obtidos por Davide e Triantaphyllou (1968) relatou que juvenis de *M. javanica* e *M. incognita* tornaram-se machos em tomateiros tratados com hidrazida maleica.
- Irradiação: a radiação gama reduz a taxa de crescimento dos juvenis e aumenta a porcentagem de machos de *M. incognita,* pois afeta a fisiologia da diferenciação sexual dos juvenis ou pode atuar indiretamente através da diminuição da capacidade do nematoide em obter alimento e utilizá-lo de forma eficiente ou afetando a capacidade das raízes irradiadas em fornecer a nutrição do nematoide em desenvolvimento (TRIANTAPHYLLOU, 1973).

Quando há a formação de fêmeas, estas continuam a inchar e, com ou sem a fertilização por um macho, produz ovos que são depositados em uma matriz gelatinosa dentro ou fora dos tecidos da raiz dependendo da posição da fêmea. Os ovos podem eclodir imediatamente ou alguns deles podem hibernar e eclodir na primavera. O ciclo de vida é completado em 25 dias a uma temperatura de 27ºC. A duração do ciclo de vida é influenciada por fatores como temperatura, umidade e planta hospedeira (AGRIOS, 2005). Segundo Taylor e Sasser (1978) a faixa ideal de temperatura para um ciclo completo da espécie *M. incognita* é 25 a 30ºC.

d) Alterações vegetais durante a infecção:

A partir do momento que ocorre o parasitismo da planta pelo nematoide iniciam complexas mudanças na expressão dos genes vegetais (GHEYSEN e FENOLL, 2002). Após dois a três dias que o juvenil se estabeleceu na raiz da planta algumas células vegetais localizadas próximas a parte anterior de seu corpo começam a aumentar de tamanho, seus núcleos se dividem e paredes celulares entre algumas células desaparecem dando origem a células gigantes. Cada galha contém de três a seis células gigantes, formadas devido a substâncias encontradas na saliva secretada pelo nematoide nas células gigantes durante sua alimentação (AGRIOS, 2005). Estas substâncias induzem a divisão nuclear sem a citocinese das células da hospedeira (WILLIAMSON e GLEASON, 2003).

Os sincícios, célula multinucleada originada a partir de repetidas mitoses de um único núcleo dentro da mesma célula formado no sistema vascular dando origem às células gigantes que podem alcançar 600 µm de comprimento e 200 µm de diâmetro. Durante o alargamento celular as células ficam metabolicamente ativas com o citoplasma muito denso, contendo diversas mitocôndrias, plastídios, ribossomos, complexos de Golgi, retículo endoplasmático liso, o vacúolo central desaparece e dá origem a vacúolos menores, o núcleo torna-se amebóide e aumenta o intercâmbio no citoplasma nuclear pelos poros da membrana nuclear (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996). Estas mudanças afetam a síntese de proteínas que se volta para o metabolismo interno ao invés de exportar da célula (JONES, 1981). O sincício é altamente especializado e depende da estimulação contínua do nematoide (BIRD, 1974).

e) Composição da secreção salivar:

A rotina de alimentação do nematoide inclui ciclos repetidos de inserção do estilete na célula do hospedeiro, liberando as secreções produzidas (WYSS e ZUNKE, 1986). O nematoide de galhas produz diversas enzimas que degradam a parede celular da célula da planta. Através de análises de proteoma e transcriptoma das secreções esofagianas pelo menos 60 proteínas diferentes são potencialmente secretadas pelo estilete durante o parasitismo para que haja sucesso na manipulação das respostas do hospedeiro (ABAD et al., 2009).

Para a espécie *M. incognita* foram identificadas nas secreções β-1,4 endoglucanase (celulase), poligalacturonase, calreticulina, superóxido dismutase e diversas proteases (WILLIAMSON e GLEASON, 2003). Várias isoformas de β-1,4 endoglucanases e celulases

podem agir sinergicamente ou estar associadas a complexos multienzimáticos para degradar de forma eficiente a celulose (URWIN et al., 2002).

Acredita-se que a calreticulina esteja envolvida na sinalização do cálcio e na regulação do ciclo celular durante a formação das células gigantes, e tem sido identificada como uma chave moduladora das defesas imunológicas do hospedeiro (JAUBERT et al., 2005).

Para que ocorra a expansão celular é necessária uma remodelação da parede celular que envolve um afrouxamento das reticulações de celulose e glicano, isto é alcançado através das endo-β-D glucanases, expansinas e xiloglucano endotransglicosilases, processo associado às mudanças na incorporação das redes de pectina (CAILLAUD et al., 2008).

Genes de endoglucanases e poligalacturonases são desregulados, e os genes que atuam nas rotas metabólicas, progressão do ciclo celular e transporte de água tem suas expressões aumentadas ao redor das células do sítio de alimentação (GOELLNER et al., 2001).

CAILLAUD et al. (2008) afirmam que na planta, a corismato mutase é uma enzima-chave na rota do ácido chiquímico coordenando a síntese celular de aminoácidos aromáticos e de diversos metabólitos secundários, incluindo fitohormônios, bem como as auxinas e compostos de defesa da planta como os flavonóides, ácido salicílico, fitoalexinas. No entanto, se o nematoide secretá-la no interior da célula da planta esta enzima debilita o desenvolvimento do tecido da raiz e suprime as defesas da planta, afetando a síntese destes compostos de defesa (DOYLE e LAMBERT, 2003). Segundo Abad et al. (2003) o entendimento dos mecanismos envolvidos na virulência de *Meloidogyne* é de grande importância para o manejo deste patógeno.

f) Resistência:

Diversos genes da planta conferem resistência contra os nematoides. Em raízes de tomateiro infectadas por *Meloidogyne*, genes homólogos a vários genes de defesa da planta são induzidos no local em 12 h após a inoculação (LAMBERT, 1995).

O gene mais estudado é o *Mi* do tomate que confere resistência contra três espécies do nematoide de galhas *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (WILLIAMSON e GLEASON, 2003; ABAD et al., 2003; HUSSEY e JANSSEN, 2001). Originalmente encontrado na espécie selvagem *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. (ABAD et al., 2003), este gene é caracterizado pela formação de necroses localizadas nas células da planta hospedeira perto do local que o nematoide invadiu (DROPKIN, 1969). Esta resposta de hipersensibilidade ocorre em aproximadamente 12 h após a inoculação dos juvenis nas raízes (PAULSON e

WEBSTER, 1972), mas esta resistência pode ser perdida em temperaturas acima de 28ºC (HUSSEY e JANSSEN, 2001; DROPKIN, 1969). Este tipo de mudança pode ocorrer em condições naturais em plantas que estão expostas por um período de calor prolongado (BIRD, 1974).

Experimentos realizados demonstraram que a mudança de temperatura para determinação da resistência ocorre durante as primeiras 24 a 48 h após a infecção, e quando este período de tempo é atingido, a resistência não é ativada mesmo em temperatura adequada (DROPKIN, 1969).

Segundo Mellilo et al. (2006) nas interações compatíveis de tomate e nematoide de galhas, a produção de espécies reativas de oxigênio tem sido observada no momento da invasão do nematoide (12 h após a inoculação). Apesar da necrose inicial, o sítio de alimentação continua a desenvolver e o nematoide torna-se sedentário (RICE et al., 1987). Contudo, o sítio de alimentação é cercado por tecidos necrosados e eventualmente entra em colapso.

2.2.2.3 *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood

A espécie *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood é a mais comum podendo ser encontrada em locais de clima temperado e tropical e podem se reproduzir assexuadamente por partenogênese mitótica e são endoparasitas sedentários obrigatórios de muitas espécies de plantas (TRIANTAPHYLLOU, 1985). Conhecida como o nematoide de galhas, é também considerada a mais importante economicamente, pois pode parasitar mais de 3000 espécies de plantas, ocasionando grandes danos as culturas de interesse econômico (ABAD et al., 2003).

As fêmeas desta espécie possuem as seguintes características morfológicas: formato de pêra na parte terminal; na parte anterior do corpo apresenta um estile robusto com comprimento de 15 a 16 µm; a região perineal que compreende a vulva e o ânus possui uma série de estrias cuticulares que as circundam e formam um desenho típico para esta espécie (HUNT e HANDOO, 2009). O macho desta espécie é vermiforme, migrador com um comprimento que varia entre 0,70 a 1,90 mm, com armadura labial forte; o estilete é robusto apresentando o cone reto, ocupando geralmente a metade do seu comprimento total, sendo

ocasionalmente mais curto, mostrando abertura posterior ao ápice e dotado de três bulbos na base; possui a cauda abruptamente arredondada, com espículos pares (TIHOHOD, 1997).

2.3 Mecanismos De Resistência Nas Plantas

Cada espécie de planta pode ser afetada por aproximadamente 100 espécies de diferentes tipos de fungos, bactérias, vírus e nematoides (AGRIOS, 2005). As plantas não possuem um sistema imune como os vertebrados voltados para impedir a invasão de parasitas, e não têm a capacidade de construir uma memória prévia da sua interação com os diversos microrganismos patogênicos encontrados em seu habitat. Em vez disso as plantas desenvolveram características únicas para se protegerem contra a entrada de agentes patogênicos (JONES e DANGL, 2006). A colonização das plantas pelos nematoides é similar em alguns aspectos à invasão pelos fungos (BENNETT e WALLSGROVE, 1994).

A primeira linha de defesa das plantas é a parede celular que é extremamente complexa, constituída por diversos polímeros de hidratos de carbono, glicoproteínas e compostos aromáticos (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Os principais componentes estruturais da parede celular são as microfibrilas de celulose que proporcionam a rigidez da parede celular (WILLATS et al., 2001), que é uma mistura complexa de polissacarídeos e outros polímeros reunidos e organizados por ligações covalentes e não-covalentes. As células vegetais contêm proteínas estruturais, enzimas, polímeros fenólicos e outros compostos que modificam as características físicas e químicas da parede e são classificadas em dois tipos: parede primária e secundária (TAIZ e ZEIGER, 2009).

As paredes primárias são compostas de microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos conferindo resistência e flexibilidade. São estruturas rígidas, estáveis, fortes e resistentes à degradação e contribuem para a resistência da parede celular. É composta por 25% de celulose e hemicelulose e 35% de pectinas, com 1 a 8% de proteína estrutural. Na superfície da celulose ligam-se hemiceluloses e nesta rede de celuloses-hemiceluloses encontram-se implantadas as pectinas formando uma fase gel hidratada, atuando como um preenchimento hidrofílico impedindo o colapso da rede de celulose. Já as paredes secundárias são altamente especializadas, espessas e reforçadas por lignina, podendo ser constituída por várias camadas, servindo de suporte mecânico da planta. A lignina é um polímero fenólico com um padrão de ligações complexo irregular, unindo as subunidades

aromáticas de álcool. Estas subunidades são sintetizadas a partir da fenilalanina e são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local pelas enzimas peroxidase e lacase. Devido a sua resistência mecânica a lignina reduz a suscetibilidade ao ataque de patógenos (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Várias enzimas endógenas que degradam a parede celular foram encontradas nos nematoides como as celulases que hidrolisam os polímeros de celulose em oligossacarídeos, fragilizando as microfibrilas. As classes de enzimas encontradas em nematoides do gênero *Meloidogyne* e os seus respectivos substratos são: celulases, que atuam na ligação das proteínas, expansinas cujo substrato é a celulose; endoxilanases, pectato-liases e poligalacturonases cujo substrato são xiloglucanas e as pectinas (LOZANO e SMANT, 2011).

Em geral, as plantas se defendem contra os patógenos por uma combinação de armas de dois arsenais: estruturas características que agem como barreiras físicas e inibem o patógeno de penetrar na planta, e reações bioquímicas que tomam conta das células e tecidos da planta e produzem substâncias que são tóxicas ao patógeno ou criam condições que inibem o crescimento dos mesmos na planta. A combinação das características estruturais e reações bioquímicas empregadas na defesa da planta são distintas em diferentes relações de hospedeiro-patógeno. Além disso, dentro do mesmo hospedeiro e patógeno, as combinações para a defesa dependem da idade da planta e o tipo de órgão e tecido atacado, condição nutricional da planta e condições climáticas (AGRIOS, 2005).

Estes mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos podem ser pré-formados (passivos ou constitutivos), que já estão presentes nas plantas antes do contato com os patógenos e pós-formados (ativos ou induzíveis), que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos. (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Estes mecanismos induzíveis são ativados quando a planta hospedeira reconhece os sinais enviados pelo patógeno (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Como exemplo de fatores de resistência estrutural pré-formados tem-se a presença de cutícula, estômatos, tricomas e paredes celulares espessas. Como a maioria dos patógenos conseguem ter acesso ao interior da planta, estas continuam a se defender dos invasores utilizando outras alternativas como a formação de papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça e tiloses, estes últimos são denominados de mecanismos estruturais pós-formados (PASCHOLATI, 2011).

Nos mecanismos pré-formados bioquímicos pode ocorrer a produção pela planta de substâncias de natureza química diversa como fenóis, alcalóides, lactonas, terpenóides e algumas proteínas. Como exemplo destas substâncias pré-formadas tem-se: ácido clorogênico, ácido protocatecóico e catecol, saponinas (α-tomatina, avenacinas), ácidos hidrocarboxílicos (tuliposídeos), glicosídeos fenólicos (floridizina, arbutina), inibidores protéicos e enzimas de defesa vegetal (STANGARLIN et al., 2011). Já para os pós-formados bioquímicos a planta pode produzir fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies ativas de oxigênio e fototoxinas (PASCHOLATI, 2011).

Os compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), podendo estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON e HAMMERSCHIMIDT, 1992).

Hung e Rohde (1973) identificaram a presença do ácido clorogênico como o composto fenólico em maior quantidade em raízes de tomates antes e após a infecção da planta por *M. incognita* e *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & S. Stekhoven. Propõe-se que a invasão das raízes de tomate resulta na acumulação de ácido clorogênico, distribuído em diferentes partes da plantas, o qual é oxidado pela ação da polifenoloxidase do hospedeiro, utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons originando como produto desta reação quinonas tóxicas, resultando na formação de uma coloração marrom nas áreas injuriadas (MAZZAFERA et al., 1989; PASCHOLATI, 2011).

Assim, as defesas pós-formadas ou induzidas, ausentes ou de pouca expressividade em plantas sadias, são ativadas após a invasão do patógeno ou quando a planta sofre alguma injúria. Nestes casos, além da resposta hipersensitiva, há a formação de tiloses, papilas, halos, lignificação, fitoalexinas, e o aumento na concentração ou síntese de várias proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), como β-1,3-glucanases, quitinases e peroxidases. Há também a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (RSI) em que uma planta, após exposição a um agente indutor, tem seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em outros locais distantes dele (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999). Estes mecanismos e reações de defesa podem determinar o sucesso da resistência da planta contra o ataque do fitopatógeno, evitando, assim, o estabelecimento da doença (STINTZI et al., 1993).

Quando as células vegetais são lesadas ou tratadas com certos eliciadores de baixo peso molecular a resposta de defesa vegetal inicia-se pelo reconhecimento da molécula eliciadora por proteínas presentes na membrana plasmática da célula vegetal que ativam uma

resposta defensiva que inicialmente induz a explosão oxidativa, produzindo e acumulando espécies ativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-) que disparam a peroxidação de lipídios na membrana e induzem outras respostas de defesas das células (BOWLES et al., 1991). Estas outras respostas podem agir diretamente sobre os organismos patogênicos e indiretamente deter a invasão destes organismos através de uma rápida ligação cruzada de componentes fenólicos da parede celular (TAIZ e ZEIGER, 2009). Entretanto, os nematoides de galhas podem secretar, através da cutícula, enzimas antioxidantes que são produzidas na hipoderme e desta forma protege o nematoide das respostas oxidativas do hospedeiro durante a infecção (ROBERTSON et al., 2000).

Alguns destes efeitos fisiológicos incluem a estimulação de fitoalexinas, rupturas oxidativas, síntese de etileno, despolimerização da membrana, mudanças no cálcio do citoplasma, síntese induzida de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), como quitinases e glucanases entre outros. Embora o sinal para o acúmulo sistêmico das proteínas-RP é desconhecido, acredita-se que o ácido salicílico, etileno, sistemina e o jasmonato podem ser uns dos responsáveis pela ativação (PASCHOLATI, 2011).

As quitinases e β-1,3-glucanases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina e as β-1,3-glucanas, respectivamente, e podem estar envolvidas na defesa das plantas contra patógenos podendo ser elevada nos tecidos vegetais em resposta à infecção e a tratamentos hormonais e químicos (PASCHOLATI, 2011).

Collinge et al. (1993) afirmam que a indução da quitinase é freqüentemente coordenada com a indução específica de β-1,3-glucanase e outras proteínas-RP. Tem sido relatado que a atividade da enzima quitinase é alta em cultivares resistentes nos estágios iniciais após a inoculação de patógenos quando comparada com a maioria dos cultivares suscetíveis, mas não todas as interações. Isto tem sido demonstrado em tomates infectados com *Cladosporium fulvum* e feijão inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. As quitinases e β-1,3-glucanases agem sinergicamente na inibição do crescimento de fungos, atuando diretamente no crescimento das hifas que invadem o espaço intercelular da célula da hospedeira.

Aos mecanismos de defesa da planta existem enzimas associadas no metabolismo primário e secundário como a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase (FAL). A enzima peroxidase é responsável pelas alterações metabólicas, é catalisadora da oxidação do álcool hidrocinâmico na presença do peróxido de hidrogênio, originando a lignina, que por sua vez, aumenta a resistência física da parede celular, dificultando a penetração do patógeno. A FAL é a enzima do metabolismo secundário importante nas reações dos compostos fenólicos,

responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, cujo primeiro pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos. Os fatores que influenciam na FAL também influenciam na biossíntese dos compostos fenólicos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Quanto à atividade da peroxidase na resistência de plantas a nematoides Zacheo et al. (1982), em trabalho realizado com tomateiros resistentes e suscetíveis inoculados, não encontraram diferenças entre a atividade de peroxidase em raízes sãs dos cultivares resistentes e suscetíveis. Após a inoculação com *M. incognita* houve um aumento da enzima no cultivar resistente e declínio no suscetível. Giebel et al. (1971) informaram que a atividade da peroxidase era maior em variedade resistente de tomate inoculada com *M. incognita*.

Giebel (1982) afirma que a resistência da planta pode ser afetada pela fenilalanina amônia-liase (FAL) e tirosina amônia-liase (TAL). Os compostos fenólicos são associados com a resistência a *M. incognita* e em alguns casos a comparação entre cultivares resistentes e suscetíveis tem demonstrado que o nível desses compostos é maior nos primeiros até mesmo antes da inoculação das plantas com o nematoide (GIEBEL, 1982). De acordo com Goddijn et al. (1993) nesta interação alguns genes são desprogramados no sítio de alimentação dos nematoides como, por exemplo, o gene promotor da FAL na planta o qual é ativo em raízes não infectadas e é silenciado em poucos dias após a infecção pelo nematoide.

Segundo Brueske (1980) e Zacheo (1993) os níveis das atividades das enzimas FAL e peroxidase aniônica, que são induzidas no início da resposta de resistência a muitos outros agentes patogênicos, também aumentam no tomate resistente após a inoculação de nematoides. No entanto, a maioria destas enzimas também são induzidas nas plantas suscetíveis, embora haja diferença na duração da indução (WILLIAMSON et al., 1994).

O entendimento da função destas proteínas na interação nematoide-planta é dificultada pela diversidade de suas funções (GODDIJN et al., 1993). Assim, a resposta da planta à infecção varia de acordo com o modo de colonização do patógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008) e conforme suas características genéticas, pois em plantas resistentes aos nematoides do gênero *Meloidogyne* ocorre a reação de hipersensibilidade inibindo a formação do sítio de alimentação nas células da hospedeira, com uma rápida necrose localizada (SIJMONS et al., 1994). Deste modo são necessários estudos aprofundados a respeito da indução de resistência contra os fitonematoides (SALGADO e SILVA, 2005).

2.3.1 Proteínas relacionadas à patogênese

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) foram observadas pela primeira vez em 1970 em folhas de fumo Samsun NN em uma reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do fumo (TMV). Durante esta reação de hipersensibilidade ocorre o dano celular e a morte do tecido com um aumento na concentração de ácido abcísico (ABA) e etileno na planta (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999).

As proteínas-RP são um grupo de proteínas encontrado nas plantas e são tóxicas na invasão dos patógenos. Elas estão amplamente distribuídas nas plantas em pequenas quantidades, mas são produzidos em maiores quantidades após o ataque do patógeno ou estresse como a seca, salinidade, injúria, metal pesado, tratamento com eliciadores endógenos e exógenos e reguladores do desenvolvimento vegetal (AGRIOS, 2005).

Algumas proteínas-RP podem ser induzidas a partir de tratamentos com substâncias químicas, derivados de aminoácidos, sal de metais pesados, ácido salicílico, fitormônios e também podem ser induzidas pelo estresse osmótico (STINTZI et al., 1993).

Dois grupos de proteínas-RP têm sido distinguidos: as proteínas-RP ácidas que estão predominantemente localizadas nos espaços intercelulares e as proteínas-RP básicas que tem sua função similar, mas possui diferente peso molecular e seqüência de aminoácidos estando localizadas principalmente intracelularmente no vacúolo (VAN LOON, 1985).

Ambas as proteínas-RP ácidas ou básicas podem ser induzidas pelas altas concentrações de etileno (VAN LOON, 1977), ou necroses e plasmólise (estresse osmótico) (WHITE et al., 1986), entre outros.

As proteínas-RP, de acordo com sua função, relação serológica, seqüência de aminoácidos, peso molecular e outras propriedades, são classificadas em 11 famílias (VAN LOON et al., 1994).

As proteínas-RP são consideradas uma das principais estratégias de defesa da planta aos diversos patógenos, utilizando proteínas com a função de realizar a proteção da planta. Possuem propriedades bioquímicas específicas. A maioria são monômeros de baixo peso molecular (8 a 50 kDa), estáveis em baixo pH (< 3) permanecendo solúveis enquanto que outras proteínas das plantas são desnaturadas, são termoestáveis e altamente resistente às proteases. Na célula vegetal podem ser encontradas no vacúolo e apoplasto (espaço intercelular) e/ou na parede celular (EDREVA, 2005; VAN LOON e VAN STRIEN, 1999; STINTZI et al., 1993). As proteínas-RP possuem na região N-terminal uma seqüência de

aminoácidos que deve ser o responsável pela translocação da molécula do complexo de Golgi no citoplasma para o vacúolo ou para o espaço intercelular (BOL et al., 1990).

Podem atuar localmente ou sistemicamente (HEIL e BOSTOCK, 2002). Os compostos responsáveis pela sua indução incluem o ácido salicílico, etileno, xilanases, polipeptídeos sistêmicos e ácido jasmônico, entre outros. As moléculas de sinalização que induzem a síntese das proteínas-RP podem ser transportadas para outras partes da planta e reduzem a iniciação da doença e a intensidade nas partes atacadas por diversos dias ou até mesmo semanas (AGRIOS, 2005).

Stangarlin et al. (2011) afirmam que as proteínas-RP são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, podendo estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno. O papel das proteínas-RP na resistência de plantas contra microrganismos patogênicos pode ser direto ou indireto. Na ação direta, como por exemplo, tem-se a inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos. A maioria das proteínas-RP possui maior importância na ação indireta, ou seja, no processo de indução de resistência, como por exemplo, na ação preventiva contra penetração de patógenos, por ação oxidativa de componentes da parede celular vegetal por meio de peroxidases (PR-9), ou envolvimento na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro. Um número pequeno de famílias das proteínas-RP possui atividade enzimática como pode ser observado para glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, PR-8, PR-11), peroxidases (PR-9), ribonucleases (PR-10) e (PR-4), ou ação inibitória pela atividade de inibidores enzimáticos (PR-6).

2.3.1.1 Peroxidases

As peroxidases (EC 1.11.1.7; doadora de hidrogênio H_2O_2 oxirredutase) são oxirredutases que catalisam a oxidação de diversos grupos de compostos orgânicos utilizando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DAWSON, 1988) segundo a equação: H_2O_2: 2 RH + H_2O_2-> 2 R* + 2 H_2O (ROS BARCELÓ e POMAR, 2002).

As peroxidases são enzimas presentes nos tecidos das plantas, células de animais e em microrganismos. Na indução de resistência as peroxidases são muito estudadas pela sua importância nos processos de defesa (CAVALCANTI et al., 2005), incluindo respostas de hipersensibilidade, lignificação, suberização e produção de fitoalexinas (NICHOLSON e

HAMMERSCHMIDT, 1992). O aumento na atividade está diretamente relacionado à redução da severidade da doença (CAVALCANTI et al., 2005), como a síntese de lignina, no qual os álcoois de fenilpropano são unidos em um polímero pela ação dessa enzima, que catalisa a oxidação desses álcoois, gerando radicais livres intermediários que se associam de forma não enzimática em uma disposição ao acaso para formar lignina (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Segundo Chittoor et al. (1999) o acúmulo de lignina e compostos fenólicos está correlacionado com a resistência de um grande número de interações planta-patógenos. A peroxidase implica na deposição de lignina, suberina e extensina, entretanto, tem sido observada mudança na atividade desta enzima durante as interações planta-patógeno para algumas raças de patógenos específicos relacionados aos genótipos resistentes e suscetíveis.

De acordo com Stangarlin et al. (2011) mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas.

Estudos relacionados com a dinâmica da indução de genes de peroxidases quando a planta é desafiada pelo patógeno tem indicado que os genes são induzidos mais rapidamente e a um alto nível nas interações com plantas resistentes do que em interações em plantas suscetíveis (CHITTOOR et al., 1997; THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1992).

2.3.1.2 β-1,3-glucanases

As β-1,3-glucanases (E.C.3.2.1.39) bem como as quitinases e seus mRNAs correspondentes estão presentes em altas concentrações em raízes de plantas sadias (SHINSHI et al., 1987) e são expressas em diferentes níveis em raízes, caules e flores (PASCHOLATI, 2011).

Pertencem a família da PR-2, foram isoladas de diferentes plantas induzidas por agentes bióticos e abióticos e a maioria possui massa molecular de 25 a 35 kDa (STINTZI et al., 1993). Grande parte possui atividade de endoglucanase, cujo produto da reação são oligômeros de duas a seis unidades de glicose pela hidrólise do substrato β-1,3-glucana, como exemplo a linamarina (BOL et al., 1990). A β-1,3-glucana é um dos maiores componentes da parede celular de muitos fungos, sendo assim as β-1,3-glucanases tem a capacidade de degradação, liberando oligossacarídeos, com atividade elicitora dos sistemas de defesa da planta (DARVIL e ALBERSHEIM, 1984).

2.3.1.3 Quitinases

Como as β-1,3-glucanases, as quitinases (E.C. 3.2.1.14) são monômeros que possuem massa molecular entre 25 e 35 kDa, e atuam na defesa da planta contra os fungos patogênicos, no entanto, nem as quitinases e nem as β-1,3 glucanases são eficazes sozinhas (VAN LOON et al., 2006) assim devem atuar sinergicamente (STINTZI et al., 1993).

As quitinases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilgucosamina), catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas β-1,4 entre resíduos de N-acetil-β-D-glucosamina e β-D-glucosamina de quitosanas parcialmente acetiladas (MARTINS, 2008).

Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, pois a quitina é um dos principais componentes da parede celular fúngica. A atividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta a infecção e a tratamentos hormonais e químicos (PASCHOLATI e LEITE, 1995). Diversos tipos (classes) e isoformas de β-1,3 glucanases e quitinases, ácidas e básicas, com diferentes substratos específicos e atividades específicas estão constitutivamente presentes nas plantas (VAN LOON et al., 2006).

2.3.2 Outras enzimas associadas ao processo de defesa

2.3.2.1 Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (FAL) (E.C.4.3.1.5) é uma enzima muito estudada e está envolvida no metabolismo secundário em plantas. Na planta, os níveis desta enzima podem variar significativamente, em intervalos de tempo relativamente curtos em resposta a uma grande variedade de estímulos, pois é extremamente sensitiva ao estado fisiológico das plantas (CAMM e TOWERS, 1973).

A reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2009) sendo responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico,

ácido ferúlico, e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). O ácido cinâmico, um produto da reação enzimática, é precursor de uma grande variedade de constituintes secundários, alguns dos quais, por exemplo, ligninas (CAMM e TOWERS, 1973).

Nicholson e Hammerschmidt (1992) a consideram precursora da síntese de fenóis em resposta a infecção, sendo considerada por Kalaiarasan (2009) a mais importante enzima na síntese de fenóis, fitoalexinas e lignina, o qual afirma que o máximo da atividade específica da FAL nas plantas depende das partes examinadas.

De acordo com Camm e Towers (1973) a FAL é um dos fatores limitantes para a biossíntese de compostos fenólicos, pois com o aumento da sua quantidade no tecido das plantas há um aumento dos compostos fenólicos, deste modo, o aumento na atividade da FAL está relacionado com a lignificação, embora tecidos não lignificados podem também apresentar elevada atividade enzimática para esta enzima, assim não há a correlação da FAL e a lignificação nas plantas.

2.3.2.2 Polifenoloxidases

A polifenoloxidase (PFO) (EC 1.14.18.1) tem sido purificada e caracterizada em diversas espécies de plantas e em uma variedade de tecidos (MAYER, 2006).

A atividade de muitas enzimas fenol oxidases (polifenoloxidases) é geralmente alta em tecidos infectados de variedades resistentes quando comparada às variedades suscetíveis infectadas ou em plantas sadias não infectadas. A importância da atividade da PFO na resistência as doenças está na propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, que são mais tóxicas para microrganismos que os fenóis (AGRIOS, 2005). Estas enzimas são amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, sendo encontrados também em várias espécies de bactérias, numerosos fungos e algas (MAYER e HAREL, 1979). São enzimas oxidativas amplamente estudadas, cujos efeitos sobre a descoloração nos tecidos vegetais danificados e doentes têm sido conhecidos há muitos anos (CONSTABEL e BARBEHENN, 2008).

A PFO agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenóis) transformando-os em quinonas (*o*-quinonas) (MAYER e HAREL, 1979). Segundo Mayer (2006) trabalhos sobre o peso molecular das

polifenoloxidases nas plantas é diverso e variável. Deve-se supor que parte desta variabilidade é devido à proteólise parcial da enzima durante o seu isolamento.

Um aumento da atividade da PFO resultará em uma alta concentração de produtos tóxicos da oxidação e, portanto, graus mais elevados de resistência à infecção (AGRIOS, 2005).

A PFO geralmente é abundante em tecidos infectados e está envolvida nos mecanismos de defesa ou na senescência (AGRIOS, 1997), no processo de escurecimento em alimentos, principalmente em frutas e durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO et al., 2003). As PFOs e peroxidases lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos (CAMPOS et al., 2004).

2.4 Indução De Resistência

Na natureza há uma grande diversidade de microrganismos que estão diretamente em contato com as plantas, mas que não causam, na sua maioria, qualquer dano a estas, evidenciando a predominância da resistência sobre a suscetibilidade. Caso isso não ocorresse, qualquer destes microrganismos seria capaz de infectar uma planta, o que ocasionaria, em pouco tempo, a extinção das espécies vegetais (PASCHOLATI e LEITE, 1994).

A indução de resistência é também conhecida como indução de proteção ou imunidade adquirida e envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes externos que podem ser bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos (metais pesados ou acibenzolar-S-metil), sem alteração do genoma da mesma (CAVALCANTI et al., 2005; BENHAMOU e BELANGER, 1998; ROMEIRO, 2000).

A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento com o indutor) e a inoculação do patógeno (tratamento com o provocador ou desafiador) em que o agente indutor é considerado qualquer composto ou fator capaz de ativar mecanismos de defesa da planta, e o eliciador ou elicitor é a molécula presente em um indutor, responsável direto pela ativação dos mecanismos de defesa. A proteção induzida pode se manifestar local ou sistemicamente, à distância do ponto de aplicação do indutor e penetração do patógeno (PASCHOLATI, 2011).

A indução de resistência pode ocorrer em condições controladas e também no campo, cujas vantagens são: amplo espectro de ação com efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematoides; caráter sistêmico; e transmissão por enxertia. As desvantagens são: esta resistência é parcial, incompleta e com o passar do tempo pode ser necessário reativar a indução. Por outro lado, por ser parcial e inespecífica, a resistência induzida não impõe pressão de seleção sobre o patógeno, dificultando a quebra de resistência (SILVA e RESENDE, 2001).

Segundo Pascholati (2011), dependendo do indutor e da planta utilizadas, o efeito protetor pode durar desde poucos dias até algumas semanas ou mesmo por todo o período de vida da planta. A proteção induzida em plantas envolve a ativação de mecanismos de resistência representados por barreiras bioquímicas e estruturais já mencionados anteriormente.

À proteção sistêmica em plantas deve-se mencionar a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) que são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes (PASCHOLATI, 2011; STICHER et al., 1997) no sentido de que as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de infecção, como também em outros locais distantes dele (STICHER et al., 1997). Assim, a RSA envolve o acúmulo de proteínas-RP como mecanismos induzidos de defesa da planta. Quanto à rota de sinalização sua indução é salicilato – dependente, podendo resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) na planta que sofreu indução e geralmente induzida por patógenos ou ativadores químicos e a amplitude da indução é parcial (ROMEIRO, 2002).

No caso da RSI não há o acúmulo de defesas induzidas de proteínas-RP, a planta que sofreu indução não exibe alterações visuais na planta, o agente indutor é usualmente um microrganismo não patogênico e sua indução não é salicilato – dependente. A rota de sinalização é associada à jasmonatos e etileno e a amplitude da indução é generalizada (ROMEIRO, 2002).

Segundo Steiner e Schönbeck (1995) os principais critérios básicos para confirmar a real ocorrência de resistência induzida são:

- Ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante;
- Supressão da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias químicas que inibem a expressão de genes do hospedeiro;
- Necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência;

- Ausência da relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado;
- Inespecificidade de proteção;
- A resistência deve ser local e sistêmica e
- A resistência deve ser dependente do genótipo da planta.

O processo de indução de resistência gera custos para a planta, pois há a competição por substrato comum e energia no seu desenvolvimento ou quando for necessário realizar a defesa contra os patógenos. Desta forma, a planta deve balancear os investimentos nesses processos (GAYLER et al., 2004) pois apresenta um custo metabólico e envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas que são ativados a partir do momento em que ocorre a chegada do patógeno (HEIL e BOSTOCK, 2002; HAMMERSCHIMIDT e DANN, 1997). Ao contrário, a resistência constitutiva representa um custo real para a planta, que aloca seus limitados recursos na produção de defesas, independente da presença do patógeno (KUHN e PASCHOLATI, 2010).

O custo metabólico é explicado pela repressão de alguns genes (KUHN e PASCHOLATI, 2007) que pode ocorrer para balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro da planta, assim menor importância será dada a uma atividade fisiológica que no momento tornou-se secundária (LOGEMANN et al., 1995).

Segundo Kuhn e Pascholati (2007) é necessário considerar a elevação dos custos dos processos internos e os custos ecológicos ou indiretos da resistência (que requer interações com outras espécies para ser expresso), envolvendo alterações no relacionamento com organismos benéficos ou maléficos.

Heil e Baldwin (2002) definiram que o custo da resistência induzida é todo efeito negativo sobre a adaptabilidade da planta que resulta da expressão de características de defesa. Iriti e Faoro (2003) afirmam que as plantas que investem suas energias no processo de defesa, quando o patógeno está ausente, estarão desperdiçando seus recursos e, consequentemente, esta ação será refletida na sua produtividade.

2.4.1 Indutores abióticos

Desde que se iniciou o cultivo de espécies alimentícias, as doenças de plantas representa uma das principais preocupações para o homem ao longo dos últimos séculos e

juntamente a esta é acrescido à preocupação na utilização de produtos que não contamine os alimentos, solo e água e assim refletindo na qualidade de vida das populações. Devido a estes fatores, alternativas para suprir estas necessidades são estudadas e uma delas é a resistência sistêmica adquirida (RSA) (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005) e conforme Siegrist et al. (1998) é uma das alternativas mais viáveis a serem usadas a curto prazo quando se pensa na substituição dos tradicionais agroquímicos na agricultura moderna o qual é utilizado diversos compostos com capacidade de ativar a resistência.

Dentre os indutores abióticos, o ácido salicílico (AS) e seus análogos são os mais importantes. Um exemplo é o acibenzolar-S-metil (ASM), que se revelou um potente ativador de resistência sistêmica adquirida (RSA), conferindo proteção em condições de campo contra um amplo espectro de patógenos de diversas espécies de plantas cultivadas (GORLACH et al., 1996).

2.4.1.1 Acibenzolar-S-metil

A resistência em plantas pode ser quimicamente induzida com compostos que podem imitar a ação do ácido salicílico (AS) como o acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (OOSTENDORP et al., 2001). O INA e o ASM podem induzir resistência em diversas culturas e controlar doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. O ASM é o primeiro ativador químico desenvolvido para indução de resistência (WALTERS et al., 2005).

Os indutores podem atuar de diferentes formas, porém, sempre levando à ativação do sistema de defesa das plantas. O ASM é um análogo do ácido salicílico (AS), que age induzindo a ativação de genes que codificam proteínas-RP e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (RESENDE et al., 2000).

O ASM é um éster S-metil do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotióico, empregado como indutor de resistência em várias espécies vegetais. Sua eficiência é maior se comparado com AS, apresentando baixa fitotoxidez, e apresenta mecanismo de ação como mensageiro secundário, levando a expressão de genes relacionados à RSA (KUNZ et al. 1997).

A aplicação prévia de ASM em plantas resulta na ativação de diversos mecanismos de defesa, o que confere proteção sistêmica contra diferentes patógenos (IRITI e FAORO, 2003).

O ASM promove a indução das proteínas-RP tais como a β-1,3-glucanase e quitinase, que são capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicas (SILVA et al., 2001).

Silva et al. (2004) avaliaram o efeito do ASM em tomateiro inoculado com *M. incognita*, utilizando cultivares resistente Débora Plus e suscetíveis Kada e Santa Clara, e obtiveram como resultado uma redução no número de galhas em até 52,6% em relação à testemunha. A aplicação do ASM reduziu igualmente o número de galhas e massas de ovos comparadas com a testemunha não tratada, demonstrando o efeito significativo do ASM na interação nematoide-planta no aumento da resistência em plântulas suscetíveis aos J2.

Ao contrário, Salgado et al. (2007) avaliaram o efeito de indutores de resistência (fosfito de potássio, ASM, silicato de potássio e ácido salicílico) sobre *M. exigua* em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) Catuaí - 144 e dos indutores testados apenas o ASM não apresentou efeito indutor contra o nematoide nas mudas de cafeeiro tratadas, não interferindo na eclosão e mortalidade *in vitro* dos J2 de *M. exígua*, demonstrando que esse produto não possui efeito tóxico direto sobre este nematoide.

Assunção et al. (2010) testaram o efeito do ASM sobre a densidade populacional de *M. incognita* em mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e não detectaram diferenças significativas sobre a densidade populacional e o fator de reprodução do patógeno.

Resultados positivos para a resposta de indução de resistência utilizando o ASM como indutor foram obtidos em soja infectada por *Rotylenchulus reniformis* e *M. javanica*, com uma única aplicação do indutor por aspersão na parte aérea a uma concentração de 50 mg L^{-1}. As plantas tratadas com ASM, segundo Chinnasri et al. (2003), expressaram resposta de resistência para as duas espécies reduzindo a fecundidade para *M. javanica* e não exercendo efeito direto de toxidade para as duas espécies.

2.4.2 Indutores bióticos

2.4.2.1 *Bacillus cereus*

Os agentes bióticos são microrganismos viáveis ou inativados e podem ativar os mecanismos de defesa da planta (STANGARLIN e PASCHOLATI, 1994) de forma

localizada ou sistêmica, atuando no controle de patógenos como bactérias, fungos, vírus, nematoides e insetos (DUKE et al., 1987).

Este fenômeno pode acontecer em casa de vegetação e no campo e pode ser uma alternativa para controle de doenças reduzindo a utilização de produtos químicos. Os microrganismos que podem ser utilizados como indutores bióticos são os fungos e oomicetos, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), bactérias (espécies de *Bacillus*) e vírus (DI PIERO et al., 2005).

Trabalho realizado Siahpoush et al. (2011) avaliaram o efeito antagonista de *B. cereus* e ácido salicílico (AS) de forma individual e combinada no controle de *M. javanica* em pepino. A utilização do agente de biocontrole e do indutor químico reduziram o número de galhas, massa de ovos e número de ovos no sistema radicular. Análises bioquímicas foram realizadas e observou-se um aumento na atividade dos compostos de defesa como peróxido de hidrogênio e peroxidase no quarto e quinto dia após a inoculação, e após este período houve um decréscimo gradual.

Silva et al. (2004) observaram em tomateiro induzido por *B. cereus*, isolado de solo rizosférico, aumento da resistência a patógenos como *Alternaria solani*, *Oidium lycopersici* e *Stemphylium solani*.

Swarowsky (2010), utilizando o produto NemOut®, que em sua composição possuia *Bacillus lincheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma longibrachiatum*, em diferentes doses, avaliou o controle em *M. incognita* raça 3 em tomateiros cultivados em vasos, e verificou sua ação sobre a reprodução do nematoide, diminuindo a oviposição e eclosão de J2.

2.4.3 Indutores de origem biótica

Os indutores de origem biótica são os extratos, compostos ou moléculas extraídas de organismos vivos como plantas e microrganismos. Trabalhos desenvolvidos comprovam o efeito do extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais, para o controle de fitopatógenos, pois apresentam em sua constituição compostos secundários responsáveis pela indução de resistência. Estes compostos podem pertencer a diversas classes de substâncias químicas, como alcalóides, terpenos, ligninas, flavonóides, cumarinas, benzenóides, quinonas, xantonas, lactonas e esteróides entre outros (DI STASI, 1996).

O extrato bruto ou óleo essencial obtidos de plantas medicinais apresentam ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos. Como exemplo

de alguns deles tem-se: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjerona (*Origanum mangerona*), eucalipto-lima (*Eucalyptus citriodora*), erva cidreira (*Lippia alba*), cúrcuma (*Curcuma longa*), avenca (*Adiantum capillus-veneris*), cravo-de-defunto (*Tagetes patula*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) entre outros (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Meinerz (2010) induziu mecanismos de defesa em sorgo, particularmente quitinase, com a aplicação de frações parcialmente purificadas de *Adiantum capillus-veneris*, através da cromatografia de filtração em gel e precipitação com sulfato de amônio.

Franzener et al. (2007) verificou o efeito tóxico, em testes realizados *in vitro*, utilizando extratos aquosos de flores, folhas e raízes de *Tagetes patula* obtidos por infusão, em ovos e J2 de *M. incognita* e pela aplicação dos extratos aquosos em plantas inoculadas de tomateiro cv. Santa Cruz Kadá cultivadas em vaso na parte aérea, no solo ou em ambos. O maior efeito nematicida foi obtido com extrato de raiz que promoveu a mortalidade em 68% dos J2. O extrato aquoso da flor, sem diluição, inibiu em até 62,2% a formação de galhas e 61,5 e 52,8% o número de J2 no solo e de ovos nas raízes, respectivamente, comprovando o efeito nematicida e possivelmente o aumento da resistência das plantas.

Becker (2005) avaliou o efeito de extratos de capim-limão, alecrim, cúrcuma e solução de curcumina no controle de doenças de final de ciclo causadas por *Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii* e oídio (*Microsphaera difusa*) em soja. No ensaio *in vitro*, verificou que o extrato de capim-limão inibiu o crescimento micelial de *C. kikuchii* e no ensaio a campo o extrato bruto de alecrim e cúrcuma protegeram a soja contra as doenças de final de ciclo, proteção esta que não envolveu a ativação de peroxidases.

Kuhn et al. (2006) estudaram o efeito bactericida do extrato aquoso de rizomas de diferentes genótipos de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis in vitro*. Verificaram que a cúrcuma exerceu atividade antibacteriana *in vitro*, com inibição completa do crescimento da bactéria na concentração de 10% para o material proveniente de Mercedes - PR, enquanto que para cúrcuma de Jaboticabal - SP houve inibição total a 15% e de Mara Rosa - GO a 20%. A cúrcuma proveniente de Maringá - PR não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas. Os extratos de cúrcuma não apresentam efeito curativo em manivas de mandioca infectadas pelo patógeno.

Balbi-Peña et al. (2006a) avaliaram a atividade fungitóxica *in vitro* dos extratos de cúrcuma e da curcumina contra *Alternaria solani* obtendo resultados que indicaram o potencial antifúngico desses compostos contra o patógeno em que os extratos de cúrcuma a 10 e 15% não autoclavados inibiram em 38,2% e 23,2%, respectivamente, o crescimento micelial e 71,7% e 87%, respectivamente, a esporulação do fungo.

Em trabalhos realizados na casa de vegetação, Balbi-Peña et al. (2006b), observaram que a curcumina e os extratos brutos de cúrcuma apresentaram níveis de controle de pinta preta (*Alternaria solani*) do tomateiro semelhantes ao tratamento com fungicida cúprico, mas foi inferior ao tratamento com azoxystrobin. Os autores verificaram também que a aplicação de extrato de cúrcuma a 10% em plantas de tomateiro provoca uma possível indução de resistência sistêmica contra *A. solani*.

Itako et al. (2008) avaliaram o efeito de extratos brutos aquosos de mil-folhas (*Achillea millefolium*), cânfora (*Artemisia camphorata*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) no crescimento micelial, germinação e esporulação de conídios de *Alternaria solani* em ensaio *in vitro*. Os extratos brutos aquosos não inibiram o crescimento micelial, mas apresentaram efeito significativo na redução da esporulação e germinação de conídios para os tratamentos com cânfora, capim-limão e alecrim, este último reduziu a porcentagem de esporulação do fungo a partir da concentração de 10% em 78,9%. Em casa de vegetação, avaliaram o efeito protetor destes extratos em plantas de tomateiro com uma aplicação preventiva 72 h antes da inoculação do patógeno, e observaram a redução no número das lesões em relação à testemunha nas folhas acima das tratadas, indicando o efeito sistêmico dos extratos.

2.4.3.1 Alecrim

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, é originária da Região Mediterrânea e é cultivada em vários países de clima temperado, de Portugal à Austrália. A planta pertentece a família Lamiaceae, possui um porte subarbustivo lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. As flores são azulado-claras, pequenas e de aromas forte e muito agradável (LORENZI e MATOS, 2006).

O alecrim possui propriedades antioxidantes naturais e atividades anti-inflamatórias, antibacteriana, antimutagênica e anticancerígena (OLUWATUYI et al., 2004; LEE et al., 2004).

Os compostos fenólicos são representados por flavonóides (esteróides do luteol e diosmetol) e flavonas metoxiladas em C-6 e/ou C-7, e por ácidos fenólicos, sobretudo derivados cafeicos: ácido cafeico, ácido clorogênico e rosmarínico. O alecrim caracteriza-se pela presença

de diterpenos tricíclicos: ácido carnosólico; carnosol (majoritários); rosmanol; epirorosmanol; isorosmanol; rosmarinidifenol; rosmariniquinona; rosmadiol; entre outros; assim como pelos triterpenos (ácido ursólico e oleanóico) e amirinas (BRUNETON, 2001).

2.4.3.2 Cúrcuma

A cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa* L.), uma Zingiberacea originária do sudeste da Ásia, que possui o corante curcumina como um dos principais componentes do rizoma (CECÍLIO-FILHO et al., 2000). Conhecida no mercado internacional como "turmeric", contém óleos essenciais com características antioxidantes e antimicrobianas (DUARTE et al., 1989; PRUTHI, 1980).

A planta é do tipo herbácea e perene e atinge em média 120 a 150 cm de altura em condições favoráveis de clima e solo. As folhas são grandes, oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas. Possui pecíolos compridos, que reunidos em sua base, formam o pseudocaule. O rizoma principal ou central é periforme, arredondado ou ovóide, com ramificações secundárias laterais, compridas, também tuberizadas (HERTWIG, 1986). Estes crescem agrupados no solo, abaixo do colo da planta (MAIA, 1991). São os rizomas que representam o interesse econômico da cultura.

Na medicina Ayurveda a cúrcuma é usada principalmente como anti-inflamatório e na medicina tradicional chinesa é utilizado como estimulante, detergente e diurético entre outros (REMADEVI et al., 2007).

Segundo Li et al. (2011) *C. longa* é a espécie mais investigada quimicamente do gênero *Curcuma* e possui, até o momento, 235 compostos e a maioria dos compostos identificados foram os terpenóides e compostos fenólicos diarileptanóides (conhecido vulgarmente como curcumina), diarilpentanoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenóides, alcalóides e esteróis, entre outros. Os diarileptanóides e os diarilpentanoides possuem um pigmento amarelo muito utilizado na indústria alimentícia, que é encontrado aproximadamente de 3 a 15% na constituição dos rizomas da cúrcuma.

Os principais curcuminóides com atividade biológica são: curcumina, desmetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina (BALASUBRAMANYAM et al., 2003), turmerona, metil-curcumina e curcuminato de sódio (ARAÚJO e LEON, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização Do Experimento

O ensaio foi realizado no mês de maio à agosto de 2010 e conduzido em casa de vegetação com ambiente controlado à uma temperatura de 28ºC, localizada na área de cultivo protegido do Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

3.2 Cultivo Do Tomate

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) Santa Clara I 5300 da Isla (suscetível) e Ivety da Sakata (resistente à *M. javanica* e *M. incognita* raças 1, 2, 3 e 4) foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 200 células contendo substrato comercial. As mudas foram transplantadas após 15 dias de emergidas em vasos plásticos de 2 litros (L) contendo uma mistura de Latossolo Vermelho Eutroférrico (EMBRAPA, 2006), areia e composto orgânico na proporção de 2:2:1, previamente autoclavados por 1 h à 120ºC e 1 atm. Cada vaso continha três mudas de tomateiro e depois de três dias da realização do transplante, após confirmar o pegamento das mudas, iniciou-se o experimento com a aplicação dos tratamentos.

3.3 Obtenção E Identificação De *Meloidogyne incognita*

A população de *M. incognita* utilizada nos ensaios foi obtida de tomateiros cultivados e infectados com o nematoide provenientes de uma propriedade rural localizada no município de Marechal Cândido Rondon (Latitude 24º 33’ 28,45” Sul e Longitude 54º 2’ 44,62” Oeste). As raízes foram coletadas e encaminhadas para análise ao Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Marechal Cândido Rondon. Fêmeas individuais foram extraídas das raízes e identificadas com base na

configuração da região perineal (Figura 1) (HARTMAN e SASSER, 1985) e fenótipo para a isoenzima esterase (Figura 2) (CARNEIRO e ALMEIDA, 2001). A técnica eletroforese de isoenzimas foi realizada em aparelho vertical modelo MGV-202 em gel de poliacrilamida a 8,23% de concentração. Realizado as análises a espécie foi identificada como sendo *Meloidogyne incognita* e foi identificado a raça desta espécie utilizando o teste com plantas hospedeiras diferenciadoras (HARTMAN e SASSSER, 1985) e conforme os resultados obtidos foi confirmado como sendo a raça 3.

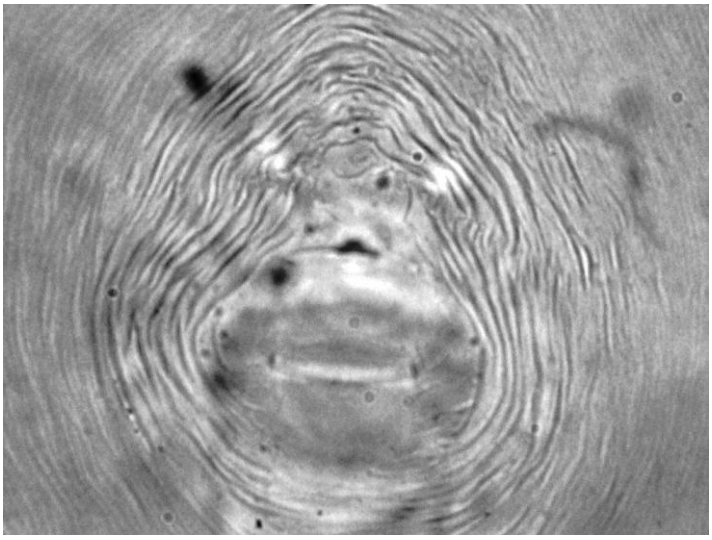

Figura 1 – Corte da região perineal de *Meloidogyne incognita*

Fonte: O autor.

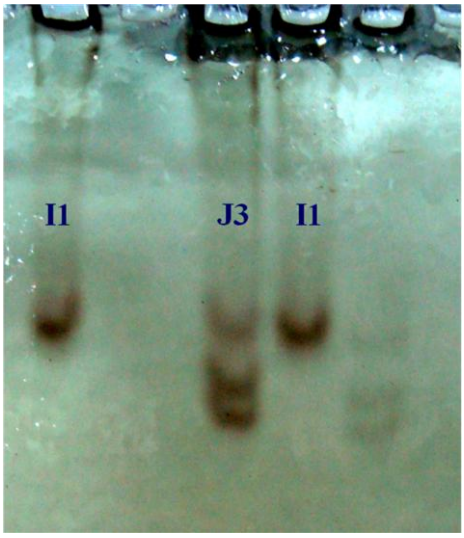

Figura 2 – Identificação pelo fenótipo da isoenzima esterase. *Meloidogyne incognita* (I1) e *Meloidogyne javanica* (J3).

Fonte: O autor.

3.3.1 Extração e quantificação de *M. incognita*

Amostras de raízes infectadas de tomateiros com *M. incognita* foram processadas para a obtenção de J2 e ovos conforme a metodologia de extração de Bonetti e Ferraz (1981). Para tanto, as raízes foram lavadas e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5%. O triturado foi passado em peneira de 48 mesh sobre peneira de 400 mesh e o resíduo da peneira de 400 mesh recolhido em tubos de centrífuga com o auxílio de um pissete com água e em seguida acrescentado o caulim. A solução (triturado + água) foi centrifugada a 1894 *g* e o sobrenadante descartado. O precipitado foi homogeneizado em solução de sacarose (densidade de 1,15 g cm^{-3}), centrifugado a 1263 *g* e o sobrenadante passado em peneira de 400 mesh. O resíduo da peneira de 400 mesh foi recolhido em béquer e 1 mL desta solução foi depositado em lâmina de Peters para a contagem de J2 e ovos.

3.4 Efeito Dos Indutores De Resistência Em Tomateiros Infectados Por *Meloidogyne incognita*

Foram realizados dois experimentos simultaneamente. O primeiro para a determinação da resposta para a atividade enzimática dos dois genótipos de tomateiros tratados e posteriormente infectados com *M. incognita*. O segundo foi realizado para determinar se houve o controle do nematoide pela aplicação dos tratamentos, avaliando a sua população através de amostragens de solo para verificar a quantidade de J2 e ovos presentes e contagem do número de galhas existentes no sistema radicular.

O experimento seguiu o esquema fatorial 2 x 6. Foram utilizados os genótipos de tomate Santa Clara I 5300 da Isla (suscetível) e Ivety da Sakata (resistente à *M. javanica* e *M. incognita* e *M.* raças 1, 2, 3 e 4) e seis tratamentos: acibenzolar-S-metil (125 mg i.a L^{-1}), *Bacillus cereus* (6.10^7 UFC mL^{-1}), alecrim 10%, cúrcuma 10%, água destilada e uma testemunha absoluta (sem inóculo e sem pulverização na parte aérea), com cinco repetições. A primeira aplicação dos indutores ocorreu três dias após o transplante e foram aplicadas em todos os vasos na parte aérea dos tomateiros, com exceção da testemunha absoluta. Às 72 h após a primeira aplicação dos tratamentos foi realizada a inoculação de 407 J2 e ovos/100 cm^3. O inóculo foi depositado próximo ao sistema radicular de cada muda de tomateiro. Este esquema foi utilizado para ambos os experimentos.

Experimento 1

Para análise de atividade enzimática os vasos de cada tratamento foram considerados como uma amostragem, e a muda de tomate em cada vaso era uma repetição. Foram realizadas cinco amostragens e cada amostragem consistia em um tempo de coleta (0 h, 24 h, 48 h, 96 h e 120 h após a indução). No tempo de 72 h ou quarto dia após a aplicação dos tratamentos, não se realizou a coleta de amostras, pois foi realizada a inoculação de J2 e ovos de *M. incognita* (Figura 3). Após a primeira aplicação dos tratamentos, um vaso de cada tratamento era recolhido e encaminhado ao Laboratório de Nematologia onde as mudas de tomateiro eram lavadas e seccionadas na região do colo separando a parte aérea do sistema radicular. O sistema radicular foi acondicionado em envelopes de papel alumínio, previamente identificado e imediatamente eram armazenadas no congelador à -20ºC.

Experimento 2

Para avaliar se houve algum efeito de controle dos tratamentos sobre a população do nematoide neste ensaio as aplicações dos tratamentos foram realizadas a cada sete dias durante 56 dias (Figura 3).

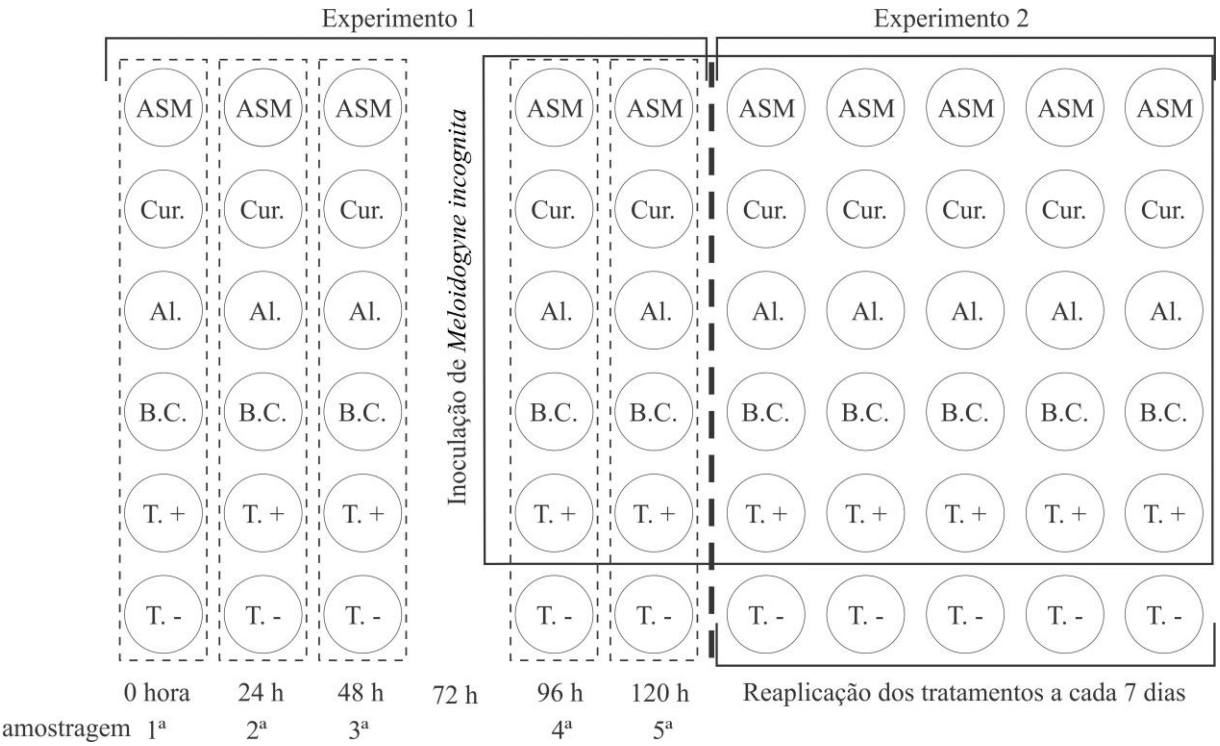

Figura 3 – Distribuição espacial dos tratamentos correspondentes ao experimento 1 e 2 para genótipo resistente e suscetível: (T-) testemunha absoluta (não tratada e não inoculada), (T+) tratamento controle com água destilada, (B.C.) tratamento com *B. cereus*, (Al.) tratamento com alecrim, (Cur.) tratamento com cúrcuma e (ASM) tratamento com acibenzolar-S-metil.

3.4.1 Preparo dos extratos vegetais e indutores biótico e abiótico

O preparo dos extratos aquosos e dos demais tratamentos era realizado no dia da aplicação e imediatamente após seu preparo era efetuada a pulverização dos mesmos na parte aérea dos tomateiros com o auxílio de borrifadores.

Para o preparo do extrato aquoso, foram pesados 10 g do rizoma de cúrcuma ou 10 g de folhas de alecrim, triturados no liquidificador com 100 mL de água destilada cada. Em seguida, foi realizada a filtração para ambos os extratos aquosos com o auxílio de um funil de porcelana com papel de filtro, estes inseridos sobre um kitassato acoplado em bomba à vácuo.

Neste experimento o produto comercial utilizado como indutor abiótico foi o Bion® cujo ingrediente ativo é o acibenzolar-S-metil (ASM), um análogo do ácido salicílico. Para o preparo da solução 0,02 g do produto comercial foi pesado em balança analítica e dissolvido em 100 mL de água destilada.

O *B. cereus* foi multiplicado em placas de Petri no dia anterior à aplicação dos tratamentos. Depois de realizada a repicagem das células bacterianas em câmara de fluxo as placas eram mantidas em uma estufa de crescimento a uma temperatura constante de 28°C. O *B. cereus* foi utilizado na concentração de 6.10^7 UFC mL^{-1} em um volume de 100 mL de água destilada, a concentração da bactéria foi determinada pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 580 nm.

Após o preparo dos tratamentos cada um deles era adicionado em seus respectivos borrifadores para posterior aplicação realizada a cada sete dias entre as 8 e 9 horas da manhã. Os tratamentos eram pulverizados na região adaxial e abaxial, das folhas cuidando para que estivessem totalmente umedecidas, mas sem atingir o ponto de escorrimento e o contato dos tratamentos com o solo. Os vasos das plantas eram agrupados de acordo com o cultivar, e os tratamentos dispostos em linhas, distribuídos na bancada de forma que estivessem separados a uma distância segura para evitar o contato entre as folhas dos tomateiros pertencentes a tratamentos distintos.

3.4.2 Avaliação do sistema radicular dos tomateiros

As plantas provenientes do experimento 2 foram encaminhadas para o Laboratório de Nematologia 56 dias após a inoculação para a realização das avaliações. As raízes dos

tomateiros foram lavadas em água corrente, em seguida secas em papel absorvente e, posteriormente, foi realizada a contagem do número de galhas presentes no sistema radicular dos tomateiros.

3.4.3 Determinação da população de *M. incognita* presentes no solo

A extração de *M. incognita* foi realizada em alíquotas de 100 cm^3 de solo, pelo método do peneiramento (peneiras de 48 sobre 400 mesh) e centrifugação em solução de sacarose densidade 1,15 g cm^{-3} (JENKINS, 1964). Os J2 e ovos retidos na peneira de 400 mesh foram transferidos para placa a lâmina de Peters para quantificação em microscópio ótico.

3.4.4 Determinação da atividade de enzimas relacionadas à defesa

3.4.4.1 Obtenção da preparação enzimática

O sistema radicular dos tomateiros coletados e armazenados foram pesados em balança analítica, e posteriormente triturados e homogeneizados em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado. O homogeneizado foi centrifugado a 6.000 *g* durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -20^oC para posteriores análises bioquímicas (STANGARLIN e PASCHOLATI, 2000).

3.4.4.2 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases (POX) foi determinada a 30°C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 2,9 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol 2% alcoólico e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,1 mL de preparação enzimática. A cubeta de referencia continha 3 mL do substrato para enzima. A

reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, pelo período de 2 min, com as medidas de densidade óptica tomadas a cada 15 seg, iniciando-se logo apos a adição da preparação enzimática ao substrato. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorbância (abs). min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

3.4.4.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade das polifenoloxidases (PPO) foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apeten (1999), adaptada por Kuhn (2007). O ensaio constituiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima polifenoloxidase. O substrato foi composto por catecol com 0,1101 g dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), formando uma solução de catecol 0,02 M. A reação se desenvolveu misturando-se 900 μL de substrato e 100 μL da preparação enzimática. A temperatura da reação foi de 30^{o}C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta em intervalo de 15 s por um período de 2 min. O diferencial entre o aumento constante da leitura da absorbância foi utilizado para a determinação da atividade. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em variação (Δ = delta) de unidade de absorbância (abs) min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

3.4.4.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL da preparação enzimática foram acrescidos de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Incubou-se essa mistura a 40^{o}C durante 2 h. Ao final desse período adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se de leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura

contendo amostra e do controle (100 μL de extrato protéico e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para acido *trans*-cinâmico (y = 0,0095x + 0,0255, onde y e a absorbância a 290 nm e x a concentração de ácido *trans*-cinâmico (μg)) e expressa em μg de ácido *trans*-cinâmico h^{-1} mg proteína^{-1}.

3.4.4.5 Atividade de β-1,3-glucanase

A atividade de β-1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELSANG e BARZ, 1993). A reação envolveu 100 μL da preparação enzimática, 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) e 150 μL de laminarina (2 mg mL^{-1}), que foi a 40^{o}C durante 1 h. O controle passou pelo mesmo processo, porém a adição de laminarina foi feita somente após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 μL da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 0,5% (HAPB) (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100^{o}C durante 10 min, resfriada, e determinada a absorbância a 410 nm. A atividade de β-1,3-glucanases consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle, a qual foi plotada em curva padrão para glicose (y = 0,002x + 0,0046, onde y é a absorbância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (μg)) e expressa em equivalente mg de glicose h^{-1} mg proteína^{-1}.

3.4.4.6 Atividade de quitinases

A atividade de quitinases foi determinada pela adição de 200 μL de CM-Chitin-RBV, sob agitação, à solução com 50 μL da preparação enzimática e 750 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5). A mistura foi incubada por 20 min a 40ºC. Após esse período as amostras foram acidificadas com 200 μL de HCl 1 M, resfriadas por 10 min em gelo com o objetivo de parar a reação e posteriormente foram centrifugadas a 9500 *g* por 6 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. O controle consistiu de 800 μL de tampão acetato

de sódio 0,1 M (pH 5) e 200 µL de CM-Chitin-RBV (WIRTH e WOLF, 1990). A atividade de quitinase foi determinada pela diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e a do controle, assumindo-se o valor de uma unidade de enzima para cada unidade de incremento na absorbância, sendo expressa em unidades de enzima min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

3.4.4.7 Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL de preparação enzimática e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brillant Blue G-250, 125 mL etanol; 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 250 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência consistiu de 800 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL de reagente. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína ($y = 0,0299x + 0,0596$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (µg)).

3.4.5 Análise dos resultados

Os dados obtidos nos experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise de variância e aplicado teste de Tukey ($P < 0,05$). O programa utilizado para análise estatística foi o software Sisvar (Versão 5.0) (FERREIRA, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos Dos Tratamentos No Controle De *M. incognita* Em Genótipos Resistente E Suscetível De Tomateiro

4.1.1 Efeito dos tratamentos no número de galhas presentes no sistema radicular

No genótipo resistente de tomateiro (Figura 4 – A) as plantas tratadas com cúrcuma apresentaram as menores médias para número de galhas presentes no sistema radicular, diferindo da testemunha (tomateiros pulverizados com água), mas não diferiu dos demais tratamentos.

Para o genótipo suscetível de tomateiro (Figura 4 – B) foi observado que os indutores bióticos, abióticos e os extratos de alecrim e cúrcuma não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram da testemunha, apresentando menor número de galhas no sistema radicular com uma redução de aproximadamente 55,4%.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Figura 4 houve diferença estatística entre os tratamentos para o genótipo resistente (A) e suscetível (B).

Na comparação de médias entre o genótipo resistente e suscetível de tomateiros (Figura 4 – C) dentro de cada tratamento, não houve diferença estatística entre os genótipos para as plantas tratadas com ASM, cúrcuma, alecrim e *B. cereus*, mas para a testemunha houve diferença significativa entre os dois genótipos, em que o genótipo suscetível apresentou maior média que o genótipo resistente.

O genótipo resistente apresentou aproximadamente 400 galhas no sistema radicular, mostrando ser hospedeira do nematoide, no entanto foi 57,84% inferior ao genótipo suscetível.

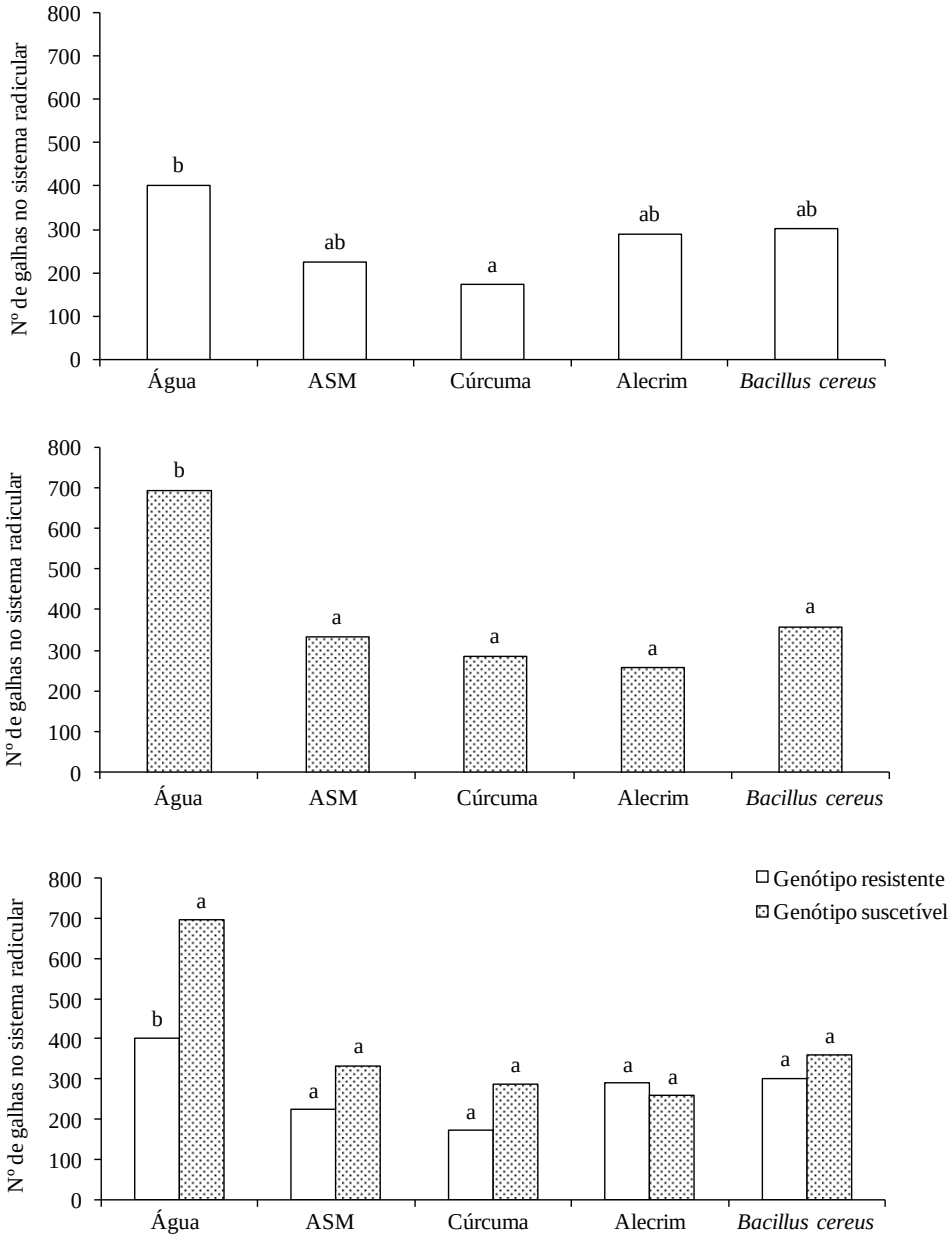

Figura 4 – Média do número de galhas presentes no sistema radicular de tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis à *Meloidogyne incognita* e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Silva et al. (2002), em trabalho realizado no patossistema *M. incognita* – tomateiro, aplicaram o ASM antes da inoculação do nematoide obtendo redução significativa no número de galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz quando comparado ao controle. Afirmaram que o ASM pode ter interferido na formação de células gigantes, afetando o seu tamanho ou sua eficácia na nutrição do J2, reduzindo a postura do nematoide no estádio adulto.

Segundo Mioranza (2012), a utilização do extrato de cúrcuma aplicado na parte aérea de plantas de soja reduziu significativamente o número de galhas no sistema radicular, obtendo aproximadamente 60% de redução com o extrato na concentração de 0,97%.

Müller (2012) em seu trabalho utilizou o extrato de alecrim aplicado na parte aérea de soja no controle de *M. incongita* na cultivar CD 206 e obteve como resultado uma redução significativa para o número de galhas com a dose mínima do extrato correspondendo a 6,68%, e para esta concentração a redução no mínimo de galhas foi de 51,38%.

Swarowsky (2010), utilizando diferentes doses do produto NemOut® em tomateiros infestados com *M. incognita*, não observou diferença significativa entre os tratamentos para o número de galhas, no entanto observou que apesar da presença das galhas as raízes apresentaram um bom desenvolvimento.

Kaplan e Keen (1980) sugerem que a falta de alguns nutrientes essenciais pode explicar a incompatibilidade de algumas plantas com os patógenos, no caso dos nematoides pode interferir na diferenciação sexual. O aumento do número de machos reduz o número de galhas na raiz minimizando os danos. Orion (1973) apud Kaplan e Keen (1980) descobriu que o cloroflurenol, um inibidor de crescimento do grupo das morfactinas, inibiu a formação de células nutridoras nas raízes de tomate, retardando o desenvolvimento do nematoide e aumentando o número de machos por inibir a divisão do núcleo dentro das células nutridoras, limitando a disponibilidade de nutriente. Trudgill (1972) apud Kaplan e Keen (1980) observou a translocação da hidrazida maleica das folhas para as raízes inoculadas, o que e impediu o estabelecimento da relação entre o patógeno-hospedeiro pela supressão da formação das células gigantes, afetando a diferenciação sexual de *M. incognita*.

4.1.2 Efeito dos tratamentos no número de ovos e juvenis de segundo estádio

Para o número de ovos quantificados em 100 cm^3 de solo, o tomateiro resistente ao nematoide (Figura 5 – A) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos aplicados.

Já para os tomateiros suscetíveis (Figura 5 – B) as plantas tratadas com alecrim apresentaram a menor média e diferiram estatisticamente das plantas que foram pulverizadas com água, mas, não diferiu dos demais tratamentos. No entanto, observando o fenômeno biológico verifica-se que os tratamentos com indutores da RSA apresentaram valores do

número de ovos igual a zero. Diferentemente do *B. cereus* que atua pela via RSI, assim é interessante que este fenômeno seja investigado com novos ensaios.

Na comparação de médias entre o genótipo resistente e suscetível de tomateiros dentro de cada tratamento (Figura 5 – C) houve diferença estatística para as plantas tratadas com ASM. Para os demais tratamentos não houve diferença significativa para o número de ovos presentes em 100 cm^3 de solo entre os genótipos resistente e suscetível.

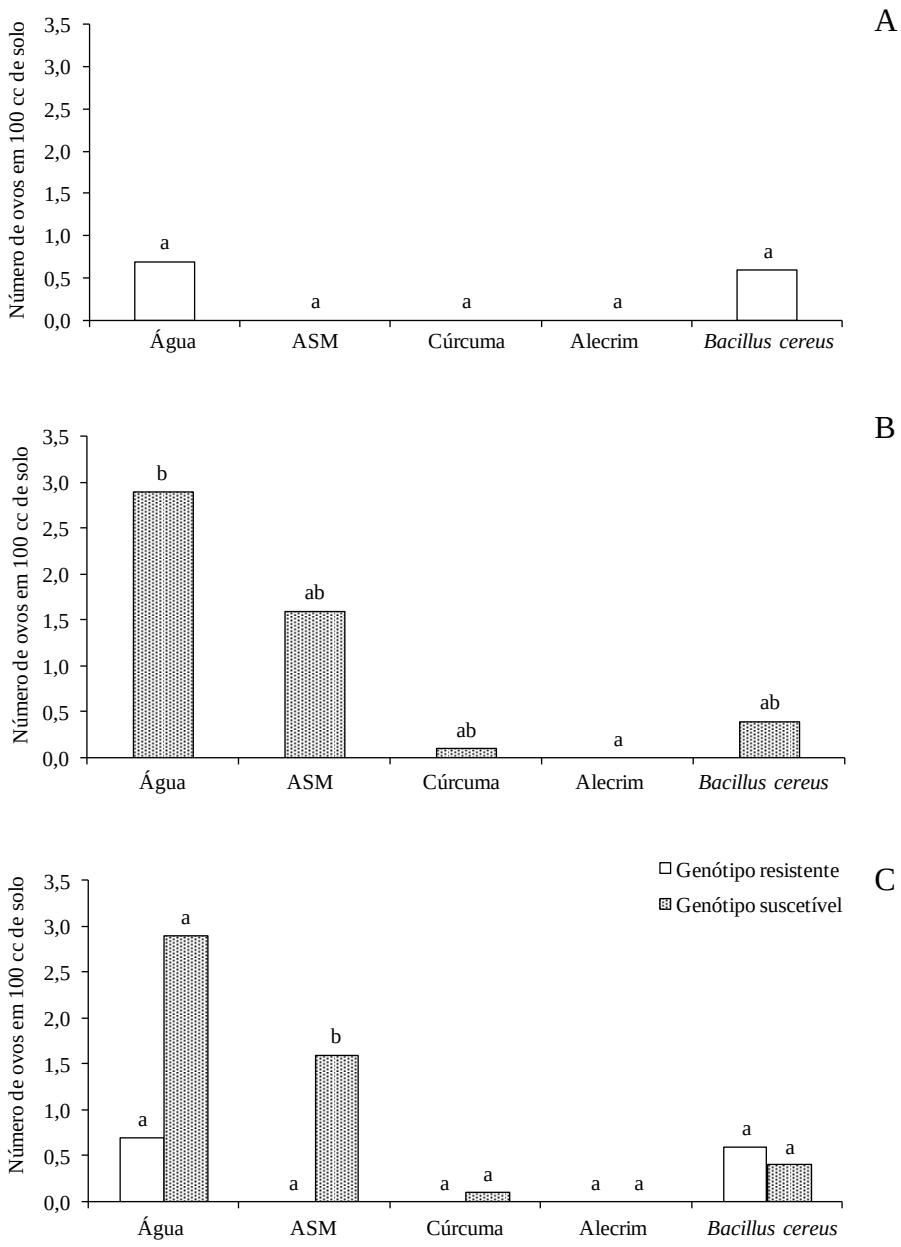

Figura 5 – Média do número de ovos de *Meloidogyne incognita* em 100 cm^3 de solo coletado em vasos contendo tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Mioranza (2012) observou aumento no número de ovos no solo em plantas de sojas infectadas com *M. incognita* quando utilizou extrato de cúrcuma a 5% e 10% aplicados na parte aérea, mas observou uma diminuição na sua quantidade com o aumento da concentração para 15%, afirmando que este efeito pode ter ocorrido devido às alterações bioquímicas nas raízes de soja pela indução de resistência pelo extrato de cúrcuma aplicado na parte aérea que pode ter criado um ambiente desfavorável para os nematoides no sistema radicular.

Müller (2012), em seu trabalho utilizando diferentes doses de alecrim (0, 1%, 5%, 10%, 15%), não observou diferença estatística significativa entre os seus tratamentos para número de ovos e J2 presentes no solo para as cultivares de soja CD 206 e CD 215.

Para o número de juvenis de segundo estádio (J2) quantificados em 100 cm^3 de solo, os tomateiros resistentes à *M. incognita* (Figura 6 – A) tratados com alecrim apresentaram a menor média, mas não diferiram estatisticamente das plantas que foram pulverizadas com água. Já para o genótipo suscetível ao nematoide (Figura 6 – B) não houve diferença significativa para o número de J2 no solo.

Na comparação entre os genótipos dentro de cada tratamento (Figura 6 – C) houve diferença significativa para as plantas tratadas com alecrim em que o genótipo resistente apresentou a menor média em relação ao suscetível, e para as plantas tratadas com *B. cereus* onde o genótipo suscetível apresentou a menor média em comparação ao resistente.

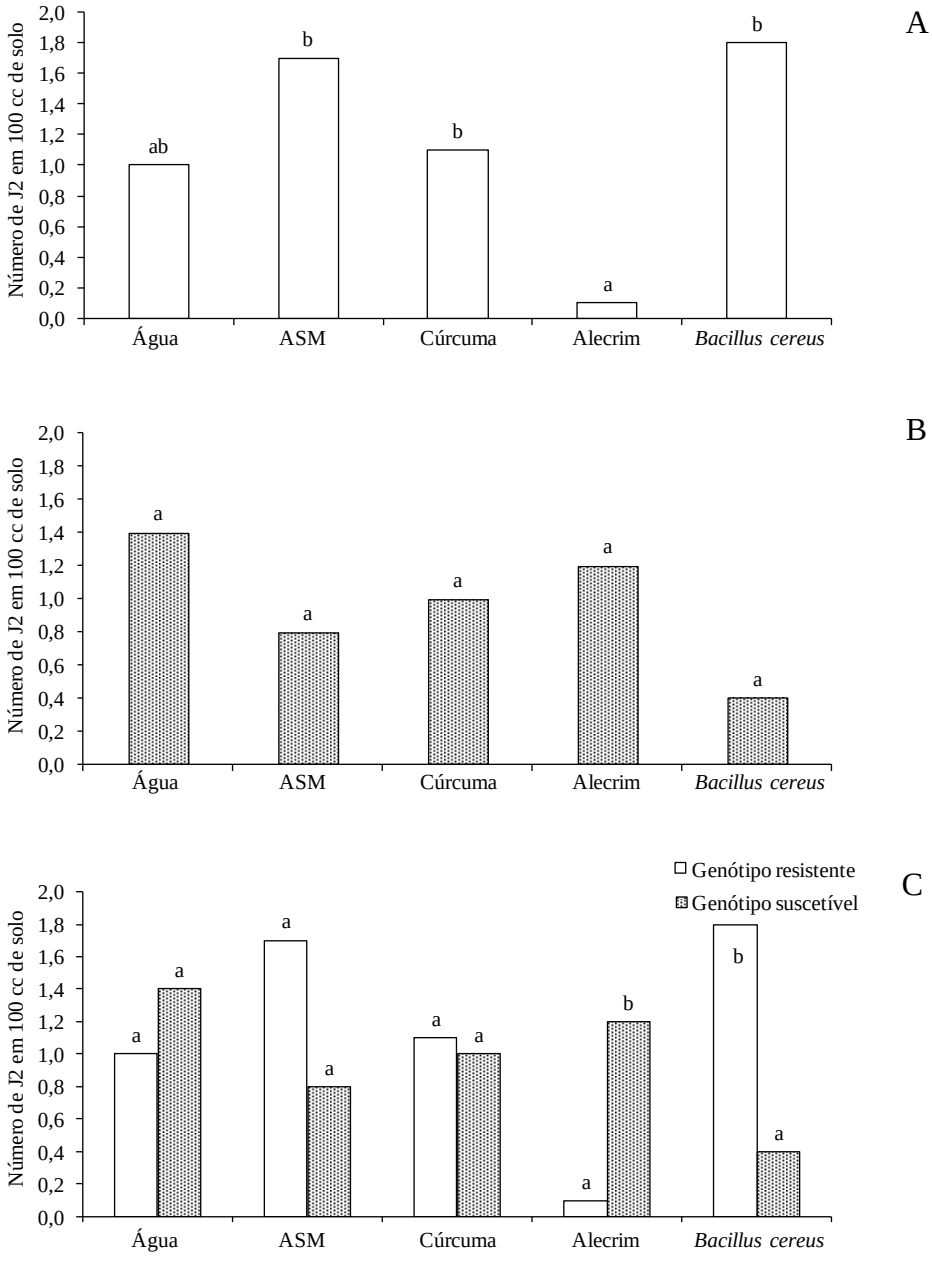

Figura 6 - Média do número de J2 de *Meloidogyne incognita* em 100 cm^3 de solo coletado em vasos contendo tomateiros (A) resistentes, (B) suscetíveis e (C) comparação de médias entre os dois genótipos para cada tratamento aplicado. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Müller (2012) afirmou que em doses mais baixas do extrato de alecrim o número de J2 de *M. incognita* pode aumentar devido ao estímulo provocado por agentes de eclosão nos ovos, que poderiam estar presentes no extrato de alecrim. Os agentes de eclosão podem alterar a atividade do juvenil no interior do ovo, fazendo com que ele consuma suas reservas energéticas, de forma a reduzir seu movimento e capacidade de infecção após eclosão. Afirmou que as baixas concentrações deste extrato podem interferir na fase de sobrevivência

do nematoide diminuindo o seu potencial de infecção visto que a concentração de 5% mostrou-se a mais eficiente para redução no número de galhas e ovos no solo.

Segundo Swarowsky (2010) o tratamento biológico sobre a reprodução do nematoide reduziu a oviposição e foi eficiente no controle de eclosão de J2 de *M. incognita*, reduzindo o número de juvenis para todas as doses testadas. Afirma que a inibição da eclosão pelos antagonistas do solo foi devido à degradação dos exsudatos radiculares que atuam como um estímulo para a eclosão dos nematoides. Além disso, estes antagonistas possuem enzimas que podem degradar a superfícies de ovos e atacar os J2 por possuírem enzimas lipolíticas, proteases e quitinases. A cutícula da maioria dos nematoides do gênero *Meloidogyne* é o composto por colágenos (CHITWOOD e PERRY, 2009) e segundo Baldwin e Perry (2004), contém componentes solúveis como glicoproteínas, lipídios e glicolipídios. Em J2 de *M. javanica* a cutícula contém aproximadamente 7% de carboidratos e a reserva de alimento dos J2 são os lipídeos do intestino.

De acordo com Curtis et al. (2009) os compostos tóxicos, incluindo extratos de plantas, tem potencial como agente de controle quando os ovos de *Meloidogyne* estão permeáveis, pois nesta fase estão vulneráveis e ficam suscetíveis aos tratamentos. Esta fragilidade acontece quando ocorrem mudanças na estrutura do ovo de *Meloidogyne*, principalmente no momento anterior a eclosão do J2, pois nesta fase, o próprio nematoide está injetando suas enzimas para romper a casca e eclodir do ovo.

Portanto, a aplicação de produtos naturais com atividade antimicrobiana e/ou indutora de resistência é uma opção de estudo para o controle alternativo de fitonematoides. Conforme STANGARLIN et al., (1999) as plantas medicinais apresentam vários metabólitos secundários capazes de exercerem estas funções.

Os nematoides, quando presentes em um ambiente com as condições favoráveis ao seu desenvolvimento, e se, a sua hospedeira for compatível e apresentar um ótimo estado nutricional, os J2 se desenvolvem e estabelecem uma relação parasitária estável, podendo evoluir para o seu estádio final de desenvolvimento e tornando-se adulto. Assim ele continuará seu ciclo e depositará ovos em uma matriz gelatinosa para continuar a perpetuação de sua espécie.

Apesar da quantidade de ovos e J2 de *M. incognita* inoculado no solo, alguma ação fisiológica na planta ocorreu para que este evento ocorresse e pode ser devido à eliminação de exsudatos radiculares pelas raízes dos tomateiros que tivessem características indesejáveis aos nematoides, com alguma substância tóxica aos J2 e ovos; ação alelopática, repelindo os nematoides; inibindo ou estimulando a eclosão dos ovos. Estes efeitos podem ter sido

estimulados em função dos tratamentos com o indutor biótico (*B. cereus*), abiótico (ASM) e dos extratos vegetais de cúrcuma e alecrim aplicados visto que, podem ter ativado algum mecanismo de defesa aumentando a resistência das plantas, estimulando a produção de algum composto e/ou favorecendo a produção de alguma substância específica, com características desagradáveis e nocivas ao nematoide, em maior concentração, consequentemente impedindo e/ou dificultando o processo de infecção ou colonização, interferindo na reprodução do nematoide, este fato pode explicar a pouca quantidade de ovos e J2 produzidos e encontrados no solo.

Como foi exposto anteriormente, Curtis et al. (2009) afirmam que os exsudatos radiculares são compostos por substâncias de baixo peso molecular e alta massa molecular, alguns deles podem ser tóxicos aos nematoides.

Também pode ter ocorrido um estímulo para a eclosão dos nematoide devido o emprego dos extratos vegetais. Segundo Dias-Arieira et al. (2008), algumas substâncias naturais podem estimular a eclosão de nematoides, por promoverem alteração na permeabilidade ou degradação da parede do ovo, considerando que as substâncias constituintes da casca do ovo do nematoide são a vitelina (localizada na camada externa), quitina (camada média) e os lipídeos (camada interna). Estes compostos poderiam estar sendo absorvidos pelos ovos, provocando algum efeito direto, degradando a casca do ovo, inativando o nematoide ou causando alguma deformação no juvenil, impedindo o seu desenvolvimento e posterior eclosão do ovo.

Wuyts et al. (2006) afirmaram que os flavonóis, uma das substâncias liberadas pelo sistema radicular, apresentam ação repelente para J2 de *M. incognita*, e o ácido salicílico atua como um nematicida e um inibidor da eclosão dos ovos quando embebidos por esta substância, a aplicação foliar com AS também suprimiu a infecção nas plantas. De acordo com Branch et al. (2004) o ácido salicílico é um importante componente da defesa de resposta ao nematoide de galhas mediada pelo gene *Mi-1* em tomate.

Wuyts et al. (2006) afirmam que existe pouca informação sobre estes compostos, incluindo os fenilpropanóides, em raízes e na rizosfera dos hospedeiros dos nematoides para realizar uma ligação entre os estudos *in vitro* e o comportamento real no solo.

4.2 Enzimas Relacionadas À Defesa

4.2.1 Relação entre genótipo resistente e suscetível de tomateiros e os tratamentos para a atividade radicular das enzimas relacionadas à defesa

Para os resultados obtidos a seguir foi determinada a área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática (A. A. C. P. A. E) para a relação entre genótipo resistente e suscetível de tomateiros dentro dos tratamentos e para a atividade radicular das enzimas analisadas em cada tratamento aplicado na parte aérea em tomateiro resistente e suscetível à *Meloidogyne incognita*. Os resultados de A. A. C. P. A. E obtidos foram submetidos ao teste de média Tukey a 5%.

Conforme os resultados expressos na Figura 7 na atividade de peroxidase (A) e polifenoloxidase (B) apresentaram diferença estatística entre os genótipos resistentes e suscetíveis para os tratamentos com ASM, cúrcuma e alecrim, não apresentando diferença para o tratamento controle com água e *Bacillus cereus*. Para a atividade de peroxidase o genótipo resistente apresentou-se 1,16; 1,16 e 1,19 vezes superior ao genótipo suscetível para as plantas tratadas na parte aérea com ASM, cúrcuma e alecrim respectivamente. Já para a atividade enzimática da polifenoloxidase o genótipo resistente foi 1,03; 1,04 e 1,05 vezes superior ao genótipo suscetível para as plantas tratadas na parte aérea com ASM, cúrcuma e alecrim respectivamente.

Os valores obtidos para o genótipo resistente foi superior quando comparado ao genótipo suscetível, esta diferença pode ser devido aos níveis constitutivos de peroxidase encontrado nas plantas de genótipo resistente. Ainda na Figura 7 para a atividade de β-1,3-glucanase (C) apenas as plantas tratadas com alecrim na parte aérea apresentou diferença estatística entre os dois genótipos em que o genótipo resistente foi 1,06 vezes superior que o genótipo suscetível.

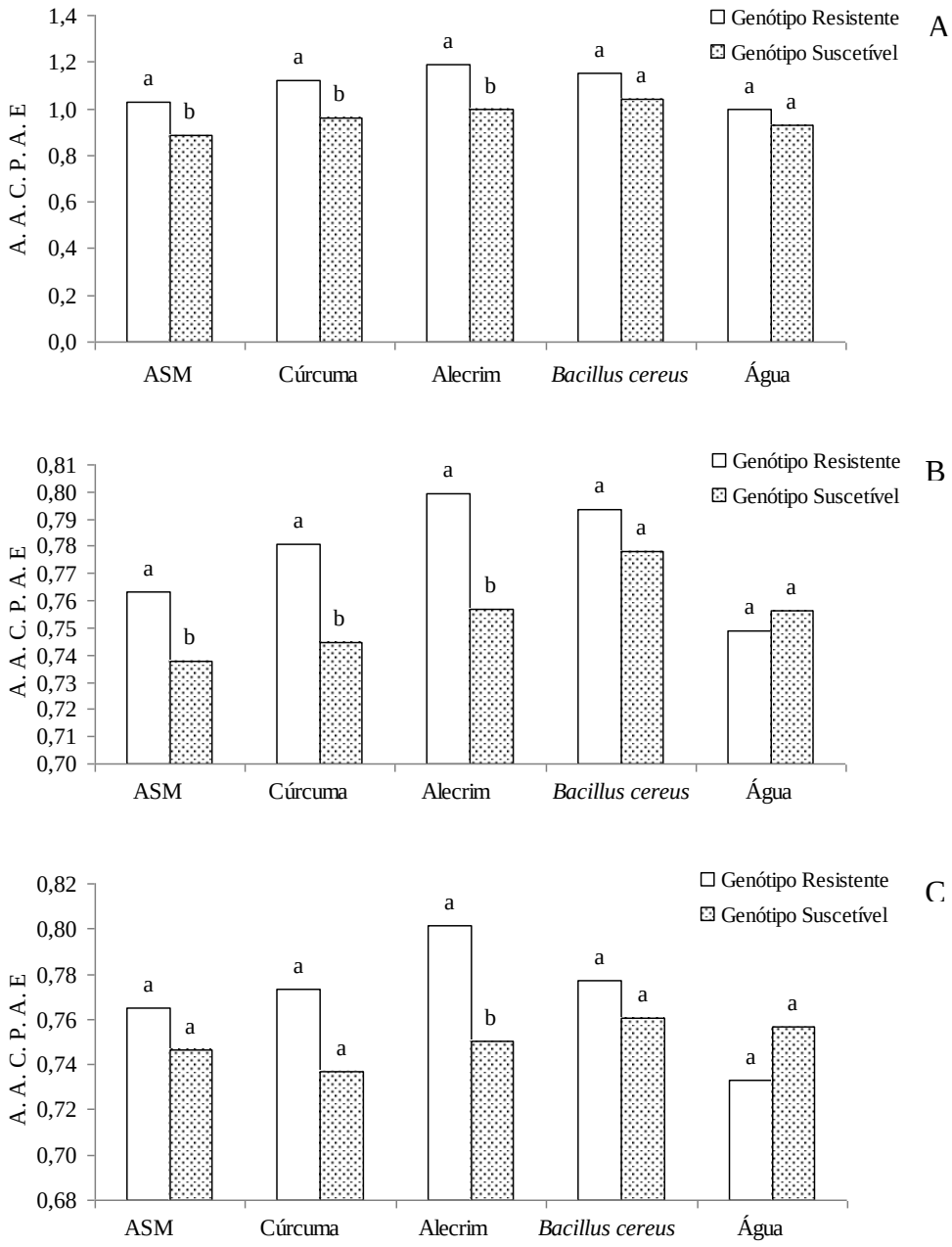

Figura 7 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática na interação das médias dos genótipos resistentes e suscetíveis de tomateiros inoculados com *Meloidogyne incognita* dentro de cada tratamento para as atividades radiculares de peroxidase (A), polifenoloxidase (B) e β-1,3 glucanase (C). Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 5,03; 1,10 e 2,52, respectivamente. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$.

Não houve diferença estatística para a A. A. C. P. A. E. na interação das médias dos genótipos resistentes e suscetíveis de tomateiros inoculados com *M. incognita* dentro de cada tratamento para as atividades radiculares das enzimas quitinase e fenilalanina amônia-liase (FAL).

Em trabalho realizado por Owen et al. (1998) detectaram maior incremento na atividade de β-1,3-glucanase nas folhas de tomateiro 28 dias após a aplicação do ASM, concluindo que a ativação da resistência afeta a fisiologia das células nutridoras, e consequentemente, a nutrição e o desenvolvimento do nematoide nas raízes.

Brueske (1980), em trabalho realizado com raízes de tomates resistentes infectados com *M. incognita*, verificou um significante aumento na atividade enzimática para FAL às 108 h após a infecção, que refletiu no aumento de compostos fenólicos nas raízes, mas às 120 h após a infecção, ocorreu um decréscimo na sua atividade. No tratamento controle e em raízes de tomate suscetível observou-se um decréscimo na atividade desta enzima. Segundo este mesmo autor, o aumento de FAL está correlacionado com a diminuição da concentração fenólica nos tecidos das raízes e um aumento na quantidade de polifenoloxidase contido nas raízes infectadas do tomateiro resistente. Estas informações dão suporte para a hipótese que a hipersensibilidade é o resultado da oxidação dos compostos fenólicos formando quinonas pela polifenoloxidase. O esgotamento da disponibilidade dos fenóis pode engatilhar um aumento na atividade de FAL. Afirmando que este aumento pode ser um indicativo da síntese de fitoalexinas contra o nematoide e que a inatividade desta enzima observada no tratamento controle e nas raízes de tomateiro suscetível infectadas não pode ser atribuída pela presença do nematoide, pois a temperatura elevada no momento da incubação (32°C) pode ter sido a limitação do substrato para a atividade de FAL. Assim, a temperatura foi um fator limitante para a atividade de FAL auxiliando na predisposição da raiz para a infecção pelo nematoide.

Na análise do efeito dos tratamentos em tomateiros resistentes para a atividade radicular de peroxidase (Figura 8 – A) foi observado que o tratamento alecrim diferiu significativamente do tratamento controle com água apresentando a média da A. A. C. P. A. E. superior em 1,19 vezes. Para a atividade radicular de polifenoloxidase (Figura 8 – B) o tratamento com alecrim diferiu significativamente dos tratamentos controles água e ASM apresentando a média da A. A. C. P. A. E. superior em 1,06 e 1,04 vezes respectivamente. O tratamento com *B. cereus* também diferiu dos tratamentos controles água e ASM apresentando a média da A. A. C. P. A. E. superior em 1,05 e 1,03 vezes respectivamente. Na atividade de β-1,3 glucanase (Figura 8 – C) também o tratamento alecrim diferiu do tratamento controle com água, com a média da A. A. C. P. A. E. superior em 1,09 vezes, não apresentando diferença estatística significativa para os demais tratamentos.

Não foi observada a diferença estatística para as médias dos tratamentos na A. A. C. P. A. E. no genótipo resistente de tomateiro inoculado com *M. incognita* para as atividades radiculares das enzimas quitinase e FAL.

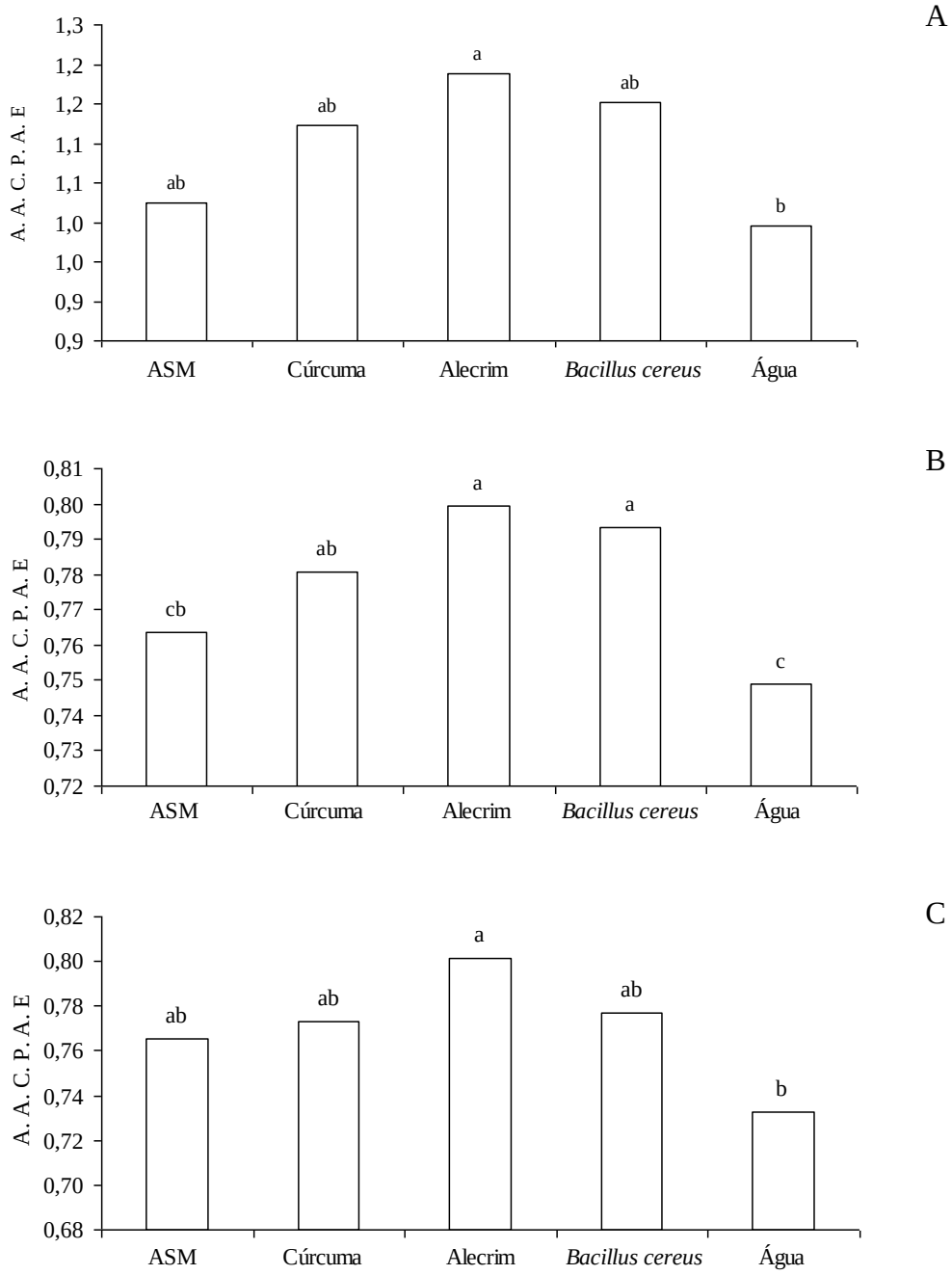

Figura 8 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática para as médias das atividades radiculares de peroxidase (A), polifenoloxidase (B) e β-1,3 glucanase (C) para cada um dos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro resistente à *Meloidogyne incognita*. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 5,03; 1,10 e 2,52, respectivamente. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$.

Na Figura 9 é apresentada a A. A. C. P. A. E. as médias da atividade radicular de polifenoloxidase para cada um dos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro suscetível à *M. incognita* em que os tratamentos alecrim e *B. cereus* e o tratamento controle

com água não diferiram estatisticamente entre si mas foram superiores em média 1,03 vezes aos tratamentos controle com ASM e cúrcuma.

Não foi observada a diferença estatística para as médias dos tratamentos na A. A. C. P. A. E. no genótipo suscetível de tomateiro inoculado com *M. incognita* para as atividades radiculares das enzimas peroxidase, β-1,3 glucanase, quitinase e FAL.

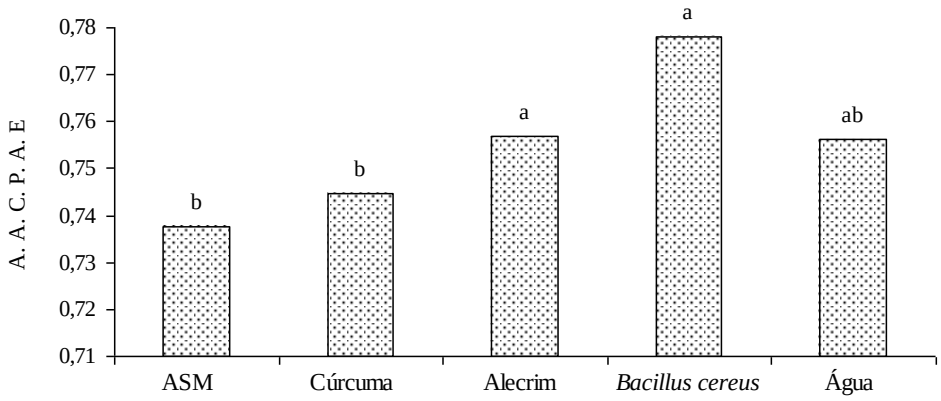

Figura 9 – Área abaixo da curva de progresso da atividade enzimática para as médias da atividade radicular de polifenoloxidase para cada um dos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro suscetível à *Meloidogyne incognita*. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). C.V (%) = 1,10. Os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$.

No trabalho desenvolvido não foi detectado atividade para a enzima FAL, no entanto, os fenóis totais não foram determinados, mas a planta pode apresentar a FAL constitutiva, armazenada, e com isso a rota dos fenilpropanóides pode ter sido ativada em algum momento produzindo os compostos fenólicos. Sabe-se que a FAL é precursora desta rota produzindo diversos compostos como derivados do ácido benzóico, cumarinas, precursores de lignina, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas, taninos condensados, ácido caféico e outros fenilpropanóides simples e amônia. O ácido clorogênico (composto fenólico caracterizado como um éster de ácido caféico e ácido quínico) (PASCHOLATI, 2011) é um dos compostos químicos encontrado na composição das plantas de alecrim e de acordo com Hung e Rohde (1973), o ácido clorogênico localiza-se em maior quantidade nas raízes de tomateiros. Após a infecção por *M. incognita* e *Pratylenchus penetrans*, este composto é oxidado pelas polifenoloxidases da planta hospedeira e produz quinonas tóxicas que possivelmente agem no controle contra os nematoides.

A amônia anidra e hidratada, uréia e outros compostos têm sido usados no controle de nematoide. A atividade nematicida da amônia depende das condições do ambiente, como o pH, temperatura e umidade. O pH do solo pode ser o mais importante fator no efeito

nematicida da amônia pois em condições de solo ácido a amônia livre (NH_3^+) em água é ionizada para o íon amônio (NH_4^+), o qual não tem efeito sobre os nematoides. Em solos básicos, a quantidade de amônia ou compostos orgânicos necessário para o controle do nematóide geralmente é menor que aquele necessário para solos ácidos (OKA et al., 2000).

4.2.2 Dinâmica da atividade enzimática

4.2.2.1 Atividade de peroxidase

Na atividade de peroxidase para o genótipo suscetível (Figura 10 - A) foi observado que nas plantas tratadas com *B. cereus* a atividade foi 3,66 vezes superior ao tratamento controle com ASM e este não diferiu das plantas tratadas com alecrim às 96 h após a aplicação dos tratamentos ou 12 h após a inoculação de *M. incognita*.

Nesta mesma figura para a atividade de peroxidase nos tomateiros resistentes (Figura 10 – B) no tempo de coleta respectivo às 48 h após a aplicação dos tratamentos observou-se que os tomateiros tratados com alecrim e *B. cereus* foram 5,33 e 5,68 vezes superiores que o controle com ASM, respectivamente. No tempo de coleta realizado às 96 h após a aplicação dos tratamentos ou 24 h após a inoculação dos ovos e J2 de *M. incognita*, os tratamentos com alecrim e *B. cereus* foram 10,16 e 9,74 vezes superiores em relação aos tratamentos controles com ASM e água, respectivamente.

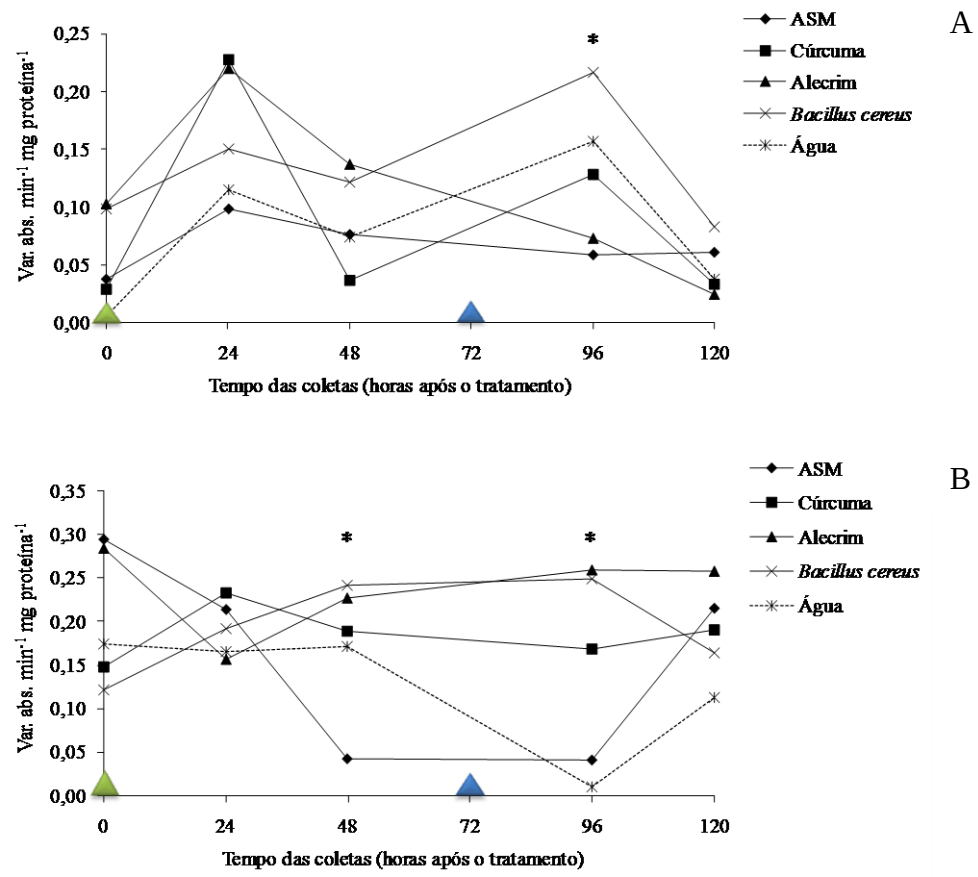

Figura 10 – Atividade radicular de peroxidase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiros suscetível (A) e resistente (B) inoculados com *Meloidogyne incognita*. ▲indica a aplicação dos tratamentos no tempo de coleta 0 hora e ▲ indica a inoculação de *M. incognita* após 72 horas. * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey.

Zacheo et al. (1982), em experimento com tomateiros infestados com *M. inco–gnita* avaliaram a atividade de enzimas peroxidase e superóxido dismutase em plantas resistentes e suscetíveis e não verificaram diferença estatística para atividade de peroxidase entre o tratamento controle e os cultivares suscetíveis e resistentes. Observaram que a infestação pelo nematoide induziu a uma diminuição na atividade de peroxidase na cultivar suscetível, ao contrário do resultado obtido para a resistente, que apresentou um aumento na atividade de peroxidase de 52% em relação ao tratamento controle. Para a enzima superóxido dismutase não houve diferença significativa entre cultivares resistentes e suscetíveis sadias. Nas plantas infestadas a sua atividade diminui na cultivar resistente e aumentou na suscetível.

Segundo Huang (1985) as células da raiz das plantas resistentes reagem na presença do patógeno com uma alta atividade para peroxidase que produziu uma grande quantidade de radicais livres. Estes radicais livres induzem a resistência na planta pela inativação do patógeno. As cultivares resistentes mantém a alta concentração dos radicais livres durante o

processo de defesa pela diminuição do nível de superóxido dismutase que de outro modo transforma os radicais superóxidos livres em peróxido de hidrogênio e eventualmente em água e oxigênio via catalase.

Kuhn (2007), utilizando como tratamentos os indutores ASM e o *B. cereus* em feijoeiro contra o crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), verificou o efeito dos tratamentos na indução de resistência com a redução da doença. Nas análises para atividade enzimática verificou maior atividade de peroxidase induzida pelos dois indutores nas plantas de feijão, afirmando que com o aumento no número de aplicação até o final do ciclo da cultura, maior foi à atividade, no entanto, para o indutor biótico a atividade foi menor quando comparada com o ASM.

Silva et al. (2004), em experimento realizado também com *B. cereus* no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, observaram uma super expressão da peroxidase, aumentando em 10 vezes a atividade. Este valor é próximo ao obtido por este trabalho, 9,74 vezes superior ao tratamento controle com água e ASM para o genótipo resistente, já o tratamento com alecrim apresentou uma atividade de 10,16 vezes superior na atividade para esta mesma enzima no genótipo resistente em relação aos tratamentos controles com ASM e água, mas o extrato de alecrim não diferiu do indutor biótico, que apresentou esta atividade principalmente após a inoculação de ovos e J2 de *M. incognita*.

Segundo Silva et al. (2004) a indução de defesa por indutores bióticos nas plantas pode apresentar níveis de eficiência na supressão do ataque do patógeno dependendo da habilidade do mesmo em ativar as respostas de defesa do hospedeiro.

4.2.2.2 Atividade de polifenoloxidase

Na Figura 11 – A para a atividade de polifenoloxidase em plantas suscetíveis os tratamentos avaliados não apresentaram diferença estatística para os tempos de coletas que avaliados.

Na Figura 11 – B para a atividade de polifenoloxidase em plantas resistentes ao nematoide, às 48 h após a aplicação dos indutores, nas plantas tratadas com *B. cereus* a atividade foi 9,45 vezes superior ao controle com ASM. Às 96 h os tratamentos alecrim e *B. cereus* foram 6,36 e 6,58 vezes superior aos tratamentos controle ASM e água, respectivamente. No tempo de coleta 120 h o tratamento com alecrim foi 3,46 vezes superior

ao tratamento controle com água e *B. cereus*, e estes últimos não diferiram entre si para este tempo de coleta.

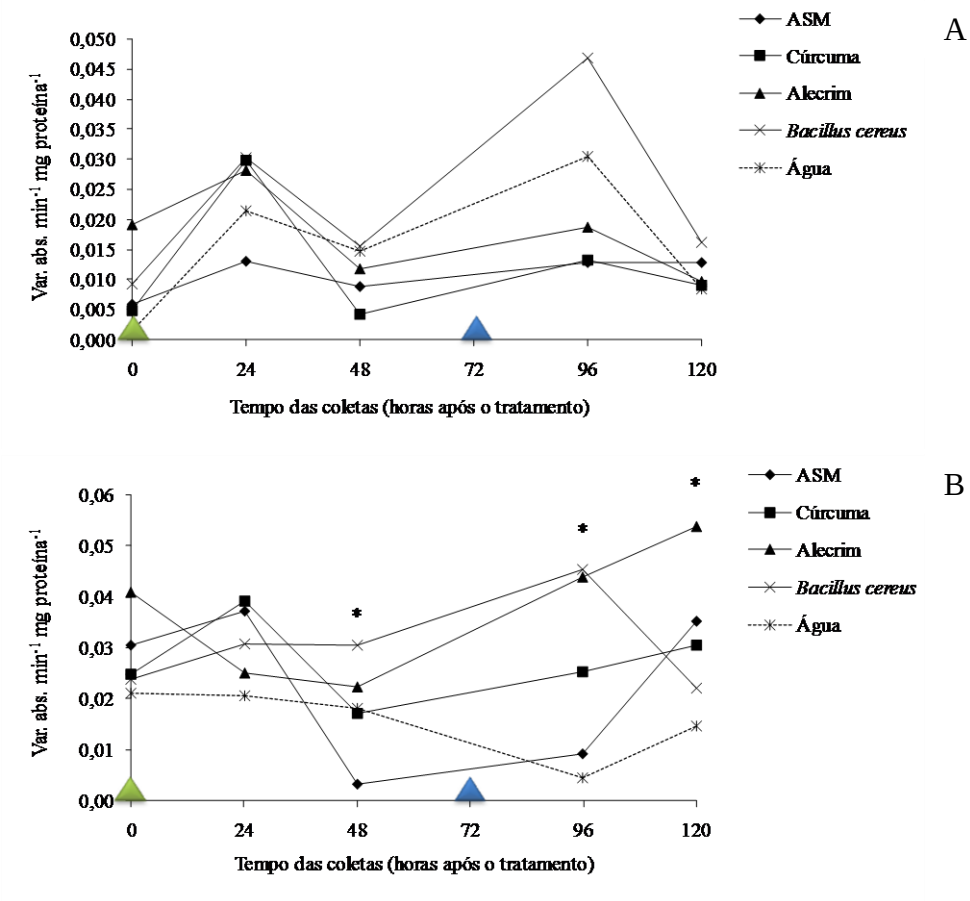

Figura 11 – Atividade radicular de polifenoloxidase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiros suscetível (A) e resistente (B) que foram inoculados com *Meloidogyne incognita*. ▲ indica a aplicação dos tratamentos no tempo de coleta 0 hora e ▲ indica a inoculação de *M. incognita* após 72 horas. * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey.

Para as enzimas peroxidase e polifenoloxidase nota-se o aumento de atividade no tratamento com *B. cereus* tanto para o genótipo de tomateiro resistente quanto para o suscetível, principalmente para o tempo de coleta correspondente às 96 h após a aplicação dos tratamentos ou às 24 h após a inoculação de ovos e J2 de *M. incognita* no solo.

O desempenho do indutor biótico é explicado por Kuhn (2007), afirmando que o *B. cereus* induz a resistência sem ativar os mecanismos diretamente, mas sim os genes envolvidos responsáveis na percepção do patógeno. Assim, a partir do momento em que o patógeno entrar em contato com a planta hospedeira, neste caso após a inoculação de J2 e ovos de *M. incognita*, a maior capacidade de percepção deste evento levará ao aumento da velocidade de resposta dos mecanismos de resistência para evitar o avanço do patógeno.

Dessa forma, a menor atividade ou expressão atenuada da atividade enzimática podem estar pré-condicionados à resistência e apresentarão maior expressão com a chegada do patógeno.

4.2.2.3 Atividade de quitinase

Para a atividade de quitinase (Figura 12), 24 h após a aplicação dos tratamentos os tomateiros pulverizados com alecrim e cúrcuma foram 3,66 e 3,77 vezes superior ao tratamento controle com água.

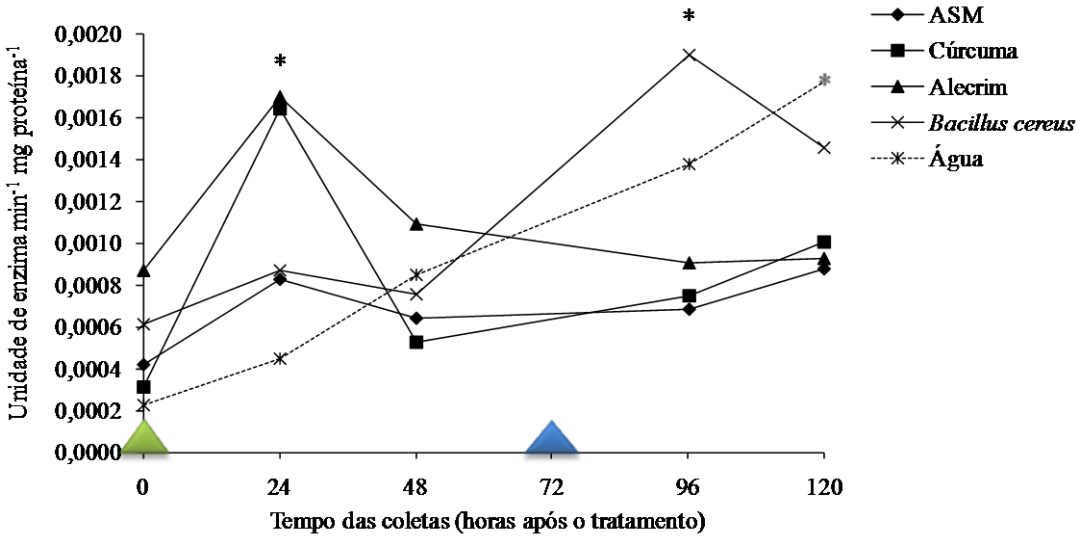

Figura 12 – Atividade radicular de quitinase relacionada aos tratamentos aplicados na parte aérea em tomateiro suscetível que foi inoculado com *Meloidogyne incognita* 72 horas ▲ após a aplicação dos tratamentos que foram realizados no tempo de coleta 0 hora ▲ . * Indica diferença estatística a 5% pelo teste Tukey.

Considerando a composição química e a rota de formação dos pigmentos curcuminóides que são biosintetizados a partir do ácido cinâmico via ácido chiquímico pelo intermédio de fenilalanina, o ácido cinâmico sofre uma metilação formando o ácido ferúlico que está presente na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e lignina e estes compostos citados poderiam influenciar na atividade de quitinase.

Ainda na figura 12 o *B. cereus* apresentou diferença significativa dos demais tratamentos com uma média superior em 2,79 vezes em relação às plantas que foram tratadas com ASM, cúrcuma e alecrim às 24 h após a inoculação de *M. incognita* ou 96 h após a aplicação dos tratamentos.

Para Kuhn (2007), utilizando como tratamentos o ASM e o *B. cereus* em feijoeiro, verificou que as atividades de quitinase e β-1,3-glucanase foram semelhantes, sendo que a atividade destas duas enzimas para o indutor ASM aumentava quando recebiam aplicação, porém, decorridos 14 dias o nível de atividade retornava a valores próximos ao controle. Para o indutor *B. cereus* não houve ativação de quitinase e β-1,3-glucanase.

Observando os resultados obtidos para a atividade das enzimas avaliadas nota-se que para o tratamento com indutor abiótico, ASM, houve menor atividade enzimática no período de tempo avaliado após a indução dos tomateiros, não diferindo do tratamento controle água para 96 h após a aplicação dos indutores no genótipo resistente, e ainda não diferiu significativamente do tratamento controle com água para o número de galhas no sistema radicular e J2 presentes no solo. Heil et al. (2000) afirmam que é de grande importância o papel do nitrogênio no processo de indução de resistência mediado pelo ASM, pois em um ambiente onde este nutriente é limitado, o gasto de energia para que a planta ative os mecanismos de defesa é maior, já que o seu sistema de defesa é dependente deste nutriente, e a sua deficiência pode comprometer a síntese de enzimas e proteínas relacionadas aos processos de defesa. A indução de resistência pelo ASM ocorre pela ativação de genes que codificam diversas proteínas relacionadas à patogênese, principalmente quitinase e glucanase e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina como a FAL e também as peroxidases (REGLINSKI et al., 1997). Observando o fato exposto, e considerando que o genótipo de tomateiro resistente seja exigente quanto a sua nutrição, possivelmente o composto orgânico utilizado para o preparo da mistura do solo pode não ter fornecido a quantidade de nitrogênio suficiente para suprir a necessidade da planta, no entanto, não foi observado nas primeiras semanas qualquer sintoma de deficiência nutricional nos tomateiros.

A indução de resistência representa uma nova tecnologia que não tem sido estudada minuciosamente para os fitonematoides como acontece com fungos fitopatogênicos. Ainda é escasso o número de publicações que podem ser utilizadas como referência para comparação de resultados e que relatam a eficácia da indução de resistência de plantas à fitonematoides, no entanto, há diversos trabalhos que demonstram a eficiência dos tratamentos utilizados neste trabalho, no controle de diversos patógenos em outras espécies vegetais.

5 CONCLUSÕES

- Houve uma redução no número de galhas no sistema radicular dos tomateiros não apresentando diferença entre os genótipos para as plantas que receberam os tratamentos com acibenzolar-S-metil, cúrcuma, alecrim e *B. cereus*.
- Os indutores avaliados mostraram resultados expressivos na redução da formação de galhas sobre a cultivar suscetível, confirmando seu potencial na proteção dos genótipos utilizados contra o ataque do *M. incognita*.
- A peroxidase foi a enzima fortemente associada à resistência com a atividade superior no genótipo resistente em relação ao suscetível independentemente do tratamento indutor.
- Em tomateiro suscetível o *B. cereus* destacou-se na indução de peroxidase e quitinase enquanto que para o tomateiro resistente o alecrim induziu peroxidase e polifenoloxidases.
- Os extratos de alecrim e cúrcuma induziram a enzima quitinase para o genótipo suscetível.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p. 217-224, 2003.

ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M. N.; ENGLER, J. A.; FAVERY, B. Invasion, feeding and development. In: PERRY R., MOENS M., STARR J. L., eds. **Root-knot Nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI International, 2009. p. 163-181.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.

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

ARENS, M. L.; RICH, J. R; DICKSON, D. W. Comparative studies on root invasion, root galling, and fecundity of three *Meloidogyne* spp. on a susceptible tobacco cultivar. **Journal of Nematology**, v. 13, p. 201-205, 1981.

ASSUNÇÃO, A.; SANTOS, L. C.; ROCHA, M. R.; REIS, A. J. S.; TEIXEIRA, R. A.; LIMA, F. S. O. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Nematologia Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 56-72, 2010.

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

ATHERTON, J. G; RUDICH, J. **The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement**, London: Chapmam and Hall, 1986. 678 p.

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, p. 715-721, 2003.

BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de Alternaria solani em tomateiro por extrato de Curcuma longa e Curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 3, p. 310-314, 2006a.

BALBI-PEÑA, M. I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de Alternaria solani em tomateiro por extratos de Curcuma longa e Curcumina. II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006b.

BALDWIN, J. G.; PERRY, R. N. Nematode morphology, sensory structure and function. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. eds.. **Nematology, Advances and Perspectives.** ACSE-TUP Book Series: "Frontiers of Science and Technology for the 21st Century" Springer Verlag New York. 2004. p. 175-257.

BECKER, A. **Controle de doenças de final de ciclo e oídio da soja por extratos aquosos de *Cymbopogom citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Curcuma longa* e solução de curcumina.** 2005. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2005.

BENHAMOU, N.; BELANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**. v. 14, n. 1, p. 13-21, 1998.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms, **New Phytologist**, Philadelphia, v. 4, n. 127, p. 617-633, 1994.

BIRD, A. F. Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle, and contents of the subventral esophageal glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching**. Journal of Parasitology,** v. 54, p. 475-489. 1968.

BIRD, A. F. Plant response to root-knot nematode. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 69-85, 1974.

BIRD, A. F.; MCCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. **Parasitology**, v. 72 , p. 19-28, 1976.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesisrelated proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 113-138, 1990.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 533, 1981.

BOWLES, W. H; TARDY, S. J; VAHADI, A. Evaluation of new gingival retraction agents. **Journal of Dental Research**, v. 70, p. 1447-9, 1991.

BRADFORD, 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.

BRANCH, C.; HWANG, C. F.; NAVARRE, D. A.; WILLIAMSON, V. M. Salicylic acid is part of Mi-1-mediated defence response to root-knot nematode in tomato. **Molecular Plant-microbe Interactions,** v. 17, p. 351-356, 2004.

BRZESKI, M. W.; HENDRICKS, E. K. The over-wintering and hatchine of *Meloidogyne hapla* Chitw. **Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych**, v. 121, p. 235-44, 1971.

BRUESKE, C. H. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato root infected and resistant to the root knot nematode *M. incognita*. **Journal Physiological Plant Pathology**, v. 16, n. 3, p. 409-414, 1980.

BRUNETON, J. **Farmagonosia, Fitoquímica. Plantas Medicinales**. Ed.l ACRIBIA S.A/Zaragosa, Espanha, 2. ed , 2001. 1099 p.

CAILLAUD, M. C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; DE ALMEIDA ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M. N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 104-113, 2008.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, v. 12, p. 961-973, 1973.

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.

CAMPOS, V. P. Doenças causadas por nematóides. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 122, p. 21-28, 1985.

CAMPOS, V. P. **Manejo de doenças causadas por fitonematóides**. Lavras, MG: UFLV/FAEPE. Gráfica Universitária, 1999. 106 p.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para a identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**. v. 1, n. 25, p. 25-44, 2001.

CARNEIRO, C. E. A; ROLIM, H. M. V; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de quariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum**: Biological Sciences. Maringá, v. 25, p. 189-193, 2003.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants, consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CASTRO, C. E.; BELSER, N. O.; MCKINNEY, H. E.; THOMASON, I. J. Strong repellency of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* by specific inorganic ions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 1199-1205, 1990.

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

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUZA, R. J.; BRAZ, L. T.; TAVARES, M. Cúrcuma: medicinal, condimentar e outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 171-175, 2000.

CHINNASRI, B.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Effects of acibenzolar-S-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, v. 35, n. 1, p. 110-114, 2003.

CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: **Pathogenesis-related proteins in plants**, Edited by Datta, S.K. and Muthukrishnan, S. Boca Raton, FL. USA, 1999. p. 171-193.

CHITTOOR, J. M.; LEACH, J. E.; WHITE, F. F., Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 7, p. 861-871, 1997.

CHITWOOD, D. F; PERRY, R. N. Reproduction, physiology and biochemistry. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. (Eds.). **Root-knot nematodes**.Wallingford, UK, CABI Publishing, 2009. p. 182-194.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K., RASMUSSEN, U., VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.

CONSTABEL, C. P.; BARBEHENN, R. **Defensive roles of polyphenol oxidases in plants. Induced plant resistance to herbivores**. New York, NY: Springer, 2008. p. 253-269.

CURTIS, R. H. C.; ROBINSON, A. F.; PERRY, R. N. Hatch and host location. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. (Eds). **Root-knot nematodes**.Wallingford, UK, CABI Publishing, 2009. p. 139-162.

DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors - A defense Against Microbial Infection in Plants. **Ann. Rev. Plant Physiol,** v. 35, p. 243-275, 1984.

DAVIDE, R. G.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes III. Effect of foliar application of maleic hydrazide. **Nematologica**, v. 14, p. 37–46, 1968.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M. N.; ABAD, P. Nematode parasitism genes. **Annual Review of Phytopathology,** v. 38, p. 365-396, 2000.

DAWSON, J, H. Probing structure-function relations in hemecontaining oxygenases and peroxidases. **Science,** v. 240, p. 433-439, 1988.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: D.L. Lee (Ed.) **The Biology of Nematodes**. London, Taylor and Francis, 2002. p. 1-30.

DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and Classification. In PERRY, R.N.; MOENS, M. (Eds). **Plant Nematology**. Wallingford: CAB International, 2006. p. 3-32.

DI PIERO, R. M., GARCIA, D., TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq. 2005. p. 29-50.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais. In: Di Stasi LC. **Plantas medicinais: arte e ciência -um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Universidade Paulista Editora; 1996. p. 109-127.

DIAS-ARIEIRA, C. R; FREITAS, L. G; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F. Fatores que afetam a eclosão de fitonematoides. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 2008. 305 p.

DOYLE, E. A.; LAMBERT, K. N. *Meloigyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 16, p. 123–131, 2003.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, v. 59, p. 1632-1637, 1969.

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

DUARTE, R. D.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Corantes - programa de pesquisa do Instituto Agronômico de Campinas. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 1, 1989, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL, 1989. p. 45-53.

DUKE, S. O.; VAUGHN, K. C.; CROOM JR, E. M.; ELSOHLY, H. N. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. **Weed Sci**, v. 35, p. 499-505, 1987.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years, Gen. Appl. **Plant Physiology**, v. 31, p. 105-124, 2005.

EISENBACK, J. D. Diagnostic Character Useful in the Identification of the Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: **An Advanced Treatise on *Meloidogyne* spp.**, SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Eds.). North Carolina State University, Raleigh, NC USA, 1985. p. 95-112.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006, p. 306.

EL-SHERIF, M.; MAI, W. F. Thermotactic response of some plant parasitic nematodes. Journal of Nematology, v. 1, p. 43-48, 1969.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Base de dados FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org> Acesso em: 04 fev. 2010.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides .In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, **A. Manual de Fitopatologia** – princípios e conceitos. Editora Ceres, São Paulo, SP, 2011. p. 277-305.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoiodes**. Viçosa: UFV, 2010. 245 p.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pela extrato aquoso de *Tagete patula*. **Nematologia Brasileira Piracicaba**, v. 31, p. 27-36, 2007.

GAYLER, S. et al. Modellingbthe effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in Young Apple trees. Springer Berlin / Heidelberg. Trees. v. 18, p. 363-371, 2004.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopatology,** v. 40, p. 124-168, 2002.

GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. **Annual Review Phytopathology**, v. 20, p. 257-279, 1982.

GIEBEL, J.; KRENZ, J.; WILSKI, A. Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. **Nematologica**, v. 17 p. 29-33, 1971.

GODDIJN, O. J.; LINDSEY, K.; VAN DER LEE, F. M.; KLAP, J. C.; SIJMONS, P. C. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs. **Plant Journal**, v. 4, n. 5, p. 863-873, 1993.

GOELLNER, M.; WANG X.; DAVIS, E.L. Endo-ß-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. **Plant Cell**, v. 13, p. 2241-2255, 2001.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N. A.; RECHCIGL, J. E. (Ed.). **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p.177-199, 1997.

HAMMERSCHIMIDT, 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.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. **An Advanced Treatise on Meloidogyne**. Methodology, North Carolina: University Graphics. v. 2, p. 69-77, 1985.

HEIL, M.; HILPERT. A.; KAISER, W.; LINSENMAIR, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defense: Does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**. v. 88, p. 645–654, 2000.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. Trends in **Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 61-67, 2002.

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

HERTWIG, I. F.Von. Curcuma. In: HERTWIG, I. F.Von. **Plantas aromáticas e medicinais**. São Paulo : Icone, 1986. p. 254-265.

HUANG, J. S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes**.** In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C., eds. **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. v. 1, Biology and Control. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 1985. p. 165-174.

HUNG, C. L.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology,** v. 5, p. 253-258, 1973.

HUNT D, J; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: PERRY, R. N; MOENS, N; STARR, J. L., eds. **Root-knot Nematodes**. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, 2009. p. 55-97.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant resistance to Parasitic Nematodes**. CABI Publishing, London, 2001. p. 43-70.

HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L.; RAY, C. *Meloidogyne* stylet secretions. In **Advances in molecular plant nematology**, LAMBERTI, F.; DE GEORGI, C.; BIRD, D. M. C. K. (Eds.). Plenum Press, New York, 1994. p. 233-249.

IBGE. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v. 24, p.1-82 abr. 2011.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003.

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.

JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J. B.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **FEBS Lett**. v. 522, p. 109-112, 2002.

JAUBERT, S.; MILAC, A. L.; PETRESCU, A. J.; DE ALMEIDA-ENGLER, J.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 18, n. 12, p. 1277-1284, 2005.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

JEPSON, S. B. Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species). Wallingford, U.K., **CAB International**, 1987. 265 p.

JONES, J. D; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

JONES, J. B. **Tomato plant culture: in fiel, greenhouse, and home garden** / J. Benton Jones, Jr. 2nd ed., 2008. 399 p.

JONES, M. G. K. Ilost cell responses to endoparasitie nematode attaek: strueture and funetion of giant eclls and syncytia. **Annals of Applied Biology**, v. 97, p. 353-372, 1981.

KALAIARASAN, P. Biochemical markers for identification of root knot nematode (Meloidogyne incognita) resistance in tomato. Karnataka **Journal of agricultural sciences**, v. 22, n. 3, p. 471-475, 2009.

KAPLAN, D. T.; KEEN, N. T. **Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes**. Departments of Nematology and Plant Pathology, University of California, Riverside, Ca 92521, USA. 1980, p. 123-134.

KARSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant nematology**. Wallingford, UK: CAB International, 2006. p. 59-90.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2007.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina Ciências Agrárias,** v. 27, p. 13-20, 2006.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos.** Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica, 2007. p.67-91.

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, n. 2, p. 107-114, 2010.

KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, v. 50, p. 275-282, 1997.

LAMBERT, K. N. **Isolation of genes induced early in the resistance response to *Meloidogyne javanica* in *Lycopersicon esculentum***. Ph.D. dissertation. University of California, Davis, CA. 1995.

LE SAUX, R.; QUÉNÉHERVÉ, P. Differential responses of two plant-parasitic nema-todes, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*, to some inorganic ions. **Nematology**, v. 4, p. 99-105, 2002.

LEE, J. Y.; HWANG, W. I.; LIM, S. T. Antioxidant and anticâncer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* a. De Candolle roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 409-415, 2004.

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

LI, S.; YUAN, W.**;** DENG, G.**;** WANG, P.**;** YANG, P.**;** AGGARWAL, B. B. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.), **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28-54, 2011.

LOGEMANN, E.; WU, S. C.; SCHRODER, J.; SCHMELZER, E.; SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. Genge activation by UV ligth, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-erlated genes. **Plant Journal**. Oxfrod, v. 8, p. 865-878, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**/ Francisco José de Abreu Matos/ Primeira Edição/ Instituto Plantarum/ Nova Odessa/ 512 pp. 2006.

LOZANO, J.; SMANT, G. Survivel of parasitic nematodes outside the host. In: PERRY, R. N.; WHARTON, D. A. (Ed). In: **Molecular and physiological basis of nematode survival**. CAB International. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office. 2011. p. 28-31.

LUZ, J. M. Q.; SHINZATO, A. V.; SILVA, M. A. D. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **Biosciense Journal**. Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 7-15, 2007.

MAHAJAN, R.; KAUR, D. J.; BAJAJ, K. L. Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 20, p. 217-219, 1992.

MAIA, N. B. A cúrcuma como corante. In: Seminário de corantes naturais, ITAL, Campinas, 65p, 1991.

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. de. O rei das hortaliças. In: REVISTA CULTIVAR HORTALIÇAS E FRUTAS, 29., dezembro/2004 - janeiro/2005. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29_rei.pdf>. Acesso em: 08 out. 2011.

MANZANILLA- LÓPEZ, R. H.; FRANCO, J.; PETEIRA, B.; KERRY, B. *Nacobbus aberrans*: Its molecular diagnosis in soil and potato tubers. Programs and Abstracts of ONTA 34th Annual Meeting, Puerto Vallarta, Mexico (October 4-8, 2004), 83 p. 2004.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 387-410. 2008.

MAYER , A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2318-2331, 2006.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v.18, n. 2, p. 193-215, 1979.

MAZZAFERA, P.; GONCALVES, W.; FERNANDES, J. A. R. Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. **Bragantia**, Campinas, v. 48, p. 131-142, 1989.

MEINERZ, C. C**. Indução de mecanismos bioquímicos de defesa em sorgo (*Sorghum bicolor*) por frações obtidas do decocto de avenca (*Adiantum capillus-veneris*).** 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Produção vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2010.

MELILLO, M. T.; LEONETTI, P.; BONGIOVANNI, M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; BLEVE-ZACHEO, T. Modulation of reactive oxygen species activities and H_2O_2 accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, v. 170, p. 501-512, 2006.

MIORANZA, T. M. **Controle de *Meloidogyne incognita* em soja por extrato de cúrcuma.** Marechal Cândido Rondon – PR. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2012.

MOENS, M.; PERRY, R. N; STARR, J. L. *Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R.N.; MOENS, M; STARR, J. L., eds. **Root-knot Nematodes.** Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17. 2009.

MÜLLER, M. A. **Controle de *Meloidogyne incognita* em soja por extrato de alecrim.** Marechal Cândido Rondon – PR. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2012.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L. DE; GOFFAU, M. DE; BARBARA, H. M.; DAM, V. D. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Fundação Agromisa e CTA, 2006.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**. v. 107, p. 19-28, 1992.

OKA, Y.; KOLTAI, H.; BAR-EYAL, M.; MOR, M.; SHARON, E.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. **Pest Management Science**. v. 56, p. 983 988, 2000.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus officinalis. **Phytochemistry,** v. 65, p. 3249-3254, 2004.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRISCH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **Eur. J. Plant Pathol**, v. 107, p. 19-28, 2001.

ORION, D. Studies on Plant Root-knot Nematode Interrelationships. **EPPO Bulletin**, v. 9, p. 67-71, 1973.

OWEN, K. J.; GREEN, C. D.; DEVERALL, B. J. Systemic acquired resistance against root-knot nematodes in grapevines. In: **International Congress of Plant Pathology**, 7., 1998. Perth. Proceedings. 1998. p. 38.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 1-51, 1994.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, p. 417-452, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres., 2011. p. 545-589.

PAULSON, R. E.; WEBSTER, J. M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentun* L., to infection by the rootknot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, v. 2, p. 227-234, 1972.

PERRY, R. N.; KNOX, D.; BEANE, J. Enzymes released during hatching of Globodera rostochiensis and *Meloidogyne incognita*. **Fundamental and Applied Nematology,** v. 15, p. 283-288, 1992

PERRY, R. N; MOENS, M. **Planta Nematology**. Edition: illustrated. Publicado por CABI. p. 73, 2006.

PERRY RN, MOENS M, STARR JL. **Root-knot nematodes**. In: EISENBACK, J. ; HUNT D. J., eds. General morphology. Virginia, USA. CABI International, p. 18-54, 2009.

PRANCE, S.G.; NESBITT, M. **The cultural history of plants**. New York: Routledge, 2005. 459 p.

PROT, J. C. Vertical migration of four natural populations of *Meloidogyne*. **Revue Nematologie**, v. 1, p. 109-112, 1978.

PRUTHI, J.S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology**. New York: Academic Press, 1980. 434 p.

REGLINSKI, T., P. R. POOLE, G. WHITAKER, AND S. M. HOYTE. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. **Plant Pathol**, v. 46, p. 716-721, 1997.

REMADEVI, R.; SURENDRAN, E.; KIMURA, T. Turmeric in Traditional medicine. In **Turmeric: the genus Curcuma**, RAVINDRAN, P. N.; NIRMAL BABU, K.; SIVARAMAN, K., Eds. CRC Press: Boca Raton, London, New York, 2007. p. 409-436.

RESENDE, M. L. V. et al. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiros contra *Crinipellis perniciosa* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 149-156, Brasília. 2000.

RICE, S.L., STONE, A.R., AND LEADBEATER, B.S.C. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst nematodes. 2. Potatoes with resistance from *Solanum vernei*. **Physiology Plant Pathology**, v. 31, p. 1-14, 1987.

ROBERTSON, L.; ROBERTSON, W. M.; SOBCZAK, J. H.; TETAUD, E.; ARIYANAYAGAM M,. R.; FERGUSON, M. A. J.; FAIRLAMB, A.; JONES, J. T. Cloning, expression and functional characterization of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Mol Biochem Parasitol,** v. 111, p. 41-49, 2000.

ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.26, p.177-184, 2000.

ROMEIRO, R. S. ISR-SAR: Pesquisa com procariotas para indução de resistência em plantas a patógenos, na Universidade Fderal de Viçosa. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS, 1., 2002, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2002. p. 87-119.

ROS BARCELÓ, A.; POMAR, F. Plant peroxidases: versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 27, p. 735-791, 2002.

SALGADO, S. M. de L.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1007-1013, 2007.

SALGADO, S. M. L.; SILVA, L. H. C. P.. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. In: CAVALCANTI, L.S., R.M. DI PIETRO, S.F. PASCHOLATI, M.L.V. RESENDE; R.S. ROMERO(ed). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos.** FEALQ, Piracicaba, 2005. p. 155-168.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F, STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, p. 129-137, 2000.

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. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SHINSHI, H . , MOHNEN , D . , MEINS, F. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 89-93, 1987.

SIAHPOUSH. S.; SAHEBANI N.; AMINIAN, H. Change of some defense compounds of cucumber treated with *Bacillus cereus* and salicylic acid against *Meloidogyne javanica*. **African Journal of Plant Science**, v. 5, p. 829-834, 2011.

SIEGRIST, J; MÜHLENBECK, S.; BUCHENAUER, H. Cultured parsley cells, a model system for the rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 53, p. 223-238, 1998.

SIJMONS, P.C., ATKINSON, H.J. AND WYSS, U. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 32, p. 235-259, 1994.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; REZENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do Acibenzolar-S-Methyl (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 294-295, 2001.

SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R. Época de aplicação do acibenzolar-S-metil e da abamectina no controle de *Meloidogyne* sp. em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 194, 2002.

SILVA, L.H.C.P., J.R. CAMPOS, M.R. DUTRA; V.P. CAMPOS. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do acibenzolar-S-metil. **Nematologia Brasileira**, v. 28, p. 199-206, 2004.

SILVA, L. H. C. P.; RESENDE, M. L. V. Resistência induzida em plantas contra patógenos. In:SILVA, L.H.C.P; CAMPOS, J.R.;NOJOSA, G.B.A. (eds.) **Manejo Integrado de Doenças e Pragas em Hortaliças**, 2001. p. 221-240.

SNYDER, D. W.; OPPERMAN, C. H.; BIRD, D. McK. A method for generating *Meloidogyne incognita* males. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 192–194, 2006.

SOUZA, J. L. **Agricultura orgânica**. Vitória: EMCAPA. v. 1, p. 169, 1998.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plantas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 16-21, 1994.

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

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (rubisco), clorofilase, b-1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.

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 Agraria Paranaenis**, v. 10, p. 18-46, 2011.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Eds.). **Induced resistance to disease in plants**. Dordrech: Kluwer Academic Publication, v. 4. p. 86-110, 1995.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology, v.** 35, p. 235-270, 1997.

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

SWAROWSKY, R. A. **Controle biológico *Meloidogyne incognita* no tomateiro com produto a base de *Bacillus* spp. e *Trichoderma longibrachiatum***. Marechal Cândido Rondon – PR. 2010. Trabalho de Conclusao de Curso (Graduação em Agronomia). UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal. Metabólitos secundários e defesa vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4a ed., 2009. cap.13, p.342-372.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh, N.C., Coop. Publ. Dep. Plant Pathol., North Carolina State Univ. and U.S. Agency Int. Dev., 1978. 111 p.

THORDAL-CHRISTENSEN, H., BRANDT, J., CHO, B. H., RASMUSSEN, S. K., GREGERSEN, P. L., SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; COLLINGE, D. B., cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, p. 395, 1992.

TIHOHOD, D. **Guia prático para a identificação de fitonematóides**. Jaboticabal: FCAV, 1997. 246p.

TRIANTAPHYLLOU, A. C. Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 11, p. 441–462, 1973.

TRIANTAPHYLLOU A. C. Cytological methods for the study of oogenesis and reproduction of root-knot nematode. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J.N. eds. **An advanced treatise on *Meloidogyne***, v. 2, Methodology. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, 1985. p. 107-14.

TRUDGILL, D. L. Influence of feeding duration on moulting and sex determination of *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**, v. 18, p. 476-481, 1972.

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.

URWIN P. E.; LILLEY C. J.; ATKINSON H. J. Ingestion of double-stranded RNA by pre-parasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 747-752, 2002.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V.. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 245-264, 1994.

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.

VAN LOON, L. C.; REP M.; PIETERSE C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** v. 44 , p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L. C., Induction by 2-chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins, and systemic resistance in tobacco, **Virology**, v. 80, p. 417, 1977.

VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 4, p. 111-122, 1985.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a beta-1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v. 189, p. 60-69, 1993.

WALLACE, H. R. Factors influencing the infectivity of plant parasitic nematodes. **Procedings of The Royal Society London B**, v. 164, p. 592-614, 1966.

WALTERS, D. R.; WALSH, D.; NEWTON, A. C.; LYON, G.D. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, v. 95, p. 1368-1373, 2005.

WHITE, R. F.; DUMAS, E.; SHAW, P.; ANTONIW, J. F., The chemical induction of PR (b) proteins and resistance to TMV infection in tobacco, **Antiviral Research**, v. 6, p. 177-185, 1986.

WILLATS W. G. T., ORFILA C., LIMBERG G., BUCHHOLT H. C., VAN ALEBEEK G.-J. W. M., VORAGEN A. G. J., MARCUS S. E., CHRISTENSEN T. M. I. E., MIKKELSEN J. D., MURRAY B. S., KNOX J. P. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19404-19413, 2001.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interaction**s. Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 327-333, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S.. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v. 8, p.1735-1745, 1996.

WILLIAMSON, V. M.; HO, J. Y.; WU, F. F.; MILLER, N.; KALOSHIAN, I. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi* in tomato. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 757-763, 1994.

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

WUYTS, N.; SWENNEN, R.; WAELE, D. de. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behavior of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leiden, v. 8, p. 89-101, 2006.

WYSS, U.; ZUNKE, U. Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. **Revue de Nématologie**, v. 9, p.153-165, 1986.

ZACHEO, G.; BLEVE-ZACHEO, T.; LAMBERT, F. Role of peroxidase and superoxide dismutase activity in resistant and suscetible tomato cultivars infected by *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea** Ban, v. 10, p. 75-80, 1982.

ZACHEO, G. **Nematode Interactions.** Khan, W.W. (ed.), Chapman and Hall, Londres, 1993. p. 1-25.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior**. Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 1239-1245, 2000.