

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

TATIANE CALANDRINO DA MATA

**FORMULADO A BASE DE ALECRIM PARA CONTROLE DE *Alternaria brassicae* E
Xanthomonas campestris pv. *campestris* EM COUVE FOLHA**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2022

TATIANE CALANDRINO DA MATA

**FORMULADO A BASE DE ALECRIM PARA CONTROLE DE *Alternaria brassicae* E
Xanthomonas campestris pv. *campestris* EM COUVE FOLHA**

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

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ
2022**

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

Mata, Tatiane Calandrino da

FORMULADO A BASE DE ALECRIM PARA CONTROLE DE *Alternaria brassicae* E *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM COUVE FOLHA / Tatiane Calandrino da Mata; orientador José Renato Stangarlin. -- Marechal Cândido Rondon, 2022.

89 p.

Tese (Doutorado Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

1. Fitopatologia. 2. Controle Alternativo de Doenças em Plantas. 3. Couve Folha - *Alternaria brassicae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 4. Indução de Resistência. I. Stangarlin, José Renato, orient. II. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

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

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

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

Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

TATIANE CALANDRINO DA MATA

Formulado a base de alecrim para controle de *Alternaria brassicae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve folha

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADA pela seguinte banca examinadora:

Orientador - José Renato Stangarlin

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

Cláudio Yuji Tsutsumi

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

Márcia de Moraes Echer

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

Kátia Regina Freitas Schwan Estrada

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Lindomar Assi

All Crim Indústria de Fertilizantes Organo-Minerais

Neumarcio Vilanova da Costa

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Marechal Cândido Rondon, 24 de fevereiro de 2022

A Deus, pelo dom da vida, seu amor e bondade em minha vida,
Ao meu pai, *in memoriam* e a minha mãe Maria de Fátima.
Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, por me sustentar, pela sua força e o seu escudo nos dias de aflição, por me conceder sabedoria e tranquilidade.

Agradeço a minha mãe Maria de Fátima Calandrino da Mata, pelo apoio, incentivo, conselhos e orações, pela qual tenho amor incondicional.

As minhas irmãs Liliane Calandrino da Mata, Ione Calandrino da Mata e Laiz Calandrino da Mata pelo carinho, apoio, alegria e principalmente pela paciência de me tolerar naqueles momentos tensos durante toda a minha caminhada.

Ao meu esposo Arnaldo Pantoja da Costa pelo amor, carinho, compreensão, conselhos e apoio de todas as horas.

Ao meu orientador professor Dr. José Renato Stangarlin, pelas orientações neste trabalho, disponibilidade, paciência para ouvir, esclarecer e compartilhar sua valiosa experiência dando-me apoio em todos os momentos, gratidão por tudo professor.

Ao professor Dr. Odair José Kuhn, pelas orientações, ensinamentos, paciência e principalmente pelas aulas de Métodos em Fitopatologia, gratidão.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo suporte estrutural, material e colaboradores, que auxiliaram no meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso, ao Dr. Neumárcio Vila Nova da Costa, coordenador do Programa de Pós-Graduação da UNIOESTE e à Leila Dirlene Allievi Werlang por sempre auxiliar com agilidade e gentileza.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNIOESTE, pelo compartilhamento dos seus conhecimentos, disponibilidade e paciência.

Aos funcionários da UNIOESTE, que sempre estavam dispostos a ajudar, em especial ao Flávio do cultivo protegido pelo auxílio e disponibilidade.

A todos os membros do grupo COBALFI e amigos da Pós-graduação que me auxiliaram as vezes que precisei, agradeço por todo auxílio e troca de conhecimento.

Aos meus amigos Eloisa Lorenzetti, Jeferson Carvalho, Guilherme Borghetti Calixto, Marta Bianchini, Noéle Khristinne Cordeiro, Wagner Nascimento, Miriam Rodrigues, Ana Karla Kempa, Renata Filler Barabasz, Rayssa Helana, Andréa C. F. Demartelaere, Patrícia Clemente Abraão, Tassiane Nunes, Jaqueline Barbosa, agradeço pelas conversas, conselhos, apoio, incentivos, enfim, por todo auxílio dado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha amiga Neves Batista pelas valiosas terapias do perdão que me acalmavam nos momentos difíceis.

Ao agricultor Olivar e família pela disponibilidade das folhas de couve que servira, para dar início aos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos demais familiares pelos momentos de alegria e descontração e que perto ou longe torcem por mim.

Enfim, a todos que me auxiliaram direta ou indiretamente, para a concretização deste estudo.

A todos minha eterna gratidão!

“Portanto, não vos inquieteis com o dia de amanhã, pois o amanhã trará seus próprios cuidados, basta ao dia o seu próprio mal.”

(Mateus 6: 34)

“O SENHOR é o meu pastor: nada me faltará.”

(Salmos 23: 1)

RESUMO

MATA, Tatiane, C. da. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Fevereiro de 2022. **Formulado a base de alecrim para controle de *Alternaria brassicae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve folha.** Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin.

Estudos têm demonstrado o potencial das plantas medicinais no controle de doenças em vegetais, tanto pela ação antimicrobiana direta, quanto pela ação indireta, através da ativação de mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antimicrobiana e indutora de mecanismos de resistência em couve folha contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) e *Alternaria brassicae*, a partir de formulados químico e orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Os tratamentos nas concentrações 0%, 0,5%, 1%, 2%, 4% e 6% dos fertilizantes foliares All Crim ConvencionalTM e All Crim OrgânicoTM foram utilizados nos ensaios *in vitro* a fim de avaliar a multiplicação bacteriana e o crescimento micelial, esporulação e germinação dos esporos de *A. brassicae* e, ensaios *in vivo*, para avaliação da severidade e análises bioquímicas das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (FAL), além de avaliação das variáveis agronômicas (massas fresca e seca de parte aérea, volume de raiz, área foliar e teor de clorofila). Os formulados químico e orgânico a base de alecrim reduziram o crescimento de *Xcc* em até 74,5% e 54,8%, respectivamente. Houve inibição do crescimento micelial em 40% e 33%, esporulação em 61,35% e 54,5% e germinação de conídios de *A. brassicae* em 77,41% e 68,22% nos formulados químico e orgânico, respectivamente. Para intensidade das doenças, houve redução da severidade da podridão negra em 37% e 35%, enquanto que para a mancha de alternaria houve redução de 61,29% e 56,30%, nos formulados químico e orgânico, respectivamente. Nos ensaios *in vivo* não houve diferença nos tratamentos para massas fresca e seca de parte aérea, volume de raiz, área foliar e teor de clorofila, entretanto, os formulados químico e orgânico induziram atividade de peroxidase e FAL tanto local quanto sistemicamente em couve folha desafiada com *X. campestris* pv. *campestris* e *A. brassicae*. Isto indica a ação de eliciadores presentes nestes formulados a base de alecrim, com efeito dose-dependente para a ativação desses mecanismos de defesa.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*. Podridão negra. Mancha de alternaria. Indução de resistência. Peroxidase. Fenilalanina amônia-liase. Polifenoloxidase.

ABSTRACT

MATA, Tatiane, C. da. Westem Paraná State University, in November 2021. **Rosemary-based formulation for controlling *Alternaria brassicae* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale leaf.** Advisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin.

Studies have shown the potential of medicinal plants to control plant diseases, both by direct antimicrobial action and indirect action, through the activation of plant defense mechanisms against pathogens. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial and resistance mechanism induction activities in leafy cabbage against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *Alternaria brassicae*, from chemical and organic formulations based on rosemary (*Rosmarinus officinalis*). The treatments at 0%, 0.5%, 1%, 2%, 4% and 6% concentrations of All Crim ConventionalTM and All Crim OrganicTM foliar fertilizers were used *in vitro* assays to evaluate bacterial multiplication and mycelial growth, sporulation and germination of spores of *A. brassicae* and, *in vivo* trials, to evaluate the severity and biochemical analysis of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase (FAL), as well as to evaluate agronomic variables (fresh and dry mass of aerial part, root volume, leaf area and chlorophyll content). The rosemary-based chemical and organic formulations reduced Xcc growth up to 74.5% and 54.8%, respectively. There was inhibition of mycelial growth by 40% and 33%, sporulation by 61.35% and 54.5% and germination of conidia of *A. brassicae* by 77.41% and 68.22% in the chemical and organic formulates, respectively. For disease intensity, there was a reduction of 37% and 35% in the severity black rot, while for alternaria spot there was a reduction of 61.29% and 56.30% in the chemical and organic formulations, respectively. In the *in vivo* assays, there were no differences between the treatments for fresh and dry masses of aerial part, root volume, leaf area and chlorophyll content, however, the chemical and organic formulations induced peroxidase and FAL activity both locally and systemically in leafy cabbage challenged with *X. campestris* pv. *campestris* and *A. brassicae*. This indicates the action of elicitors present in these rosemary-based formulations, with dose-dependent effect for the activation of these defense mechanisms.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*. Black rot. Alternaria blotch. Induction of resistance. Peroxidase. Phenylalanine ammonia-lyase. Polyphenoloxidase.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 IMPORTÂNCIA DAS HORTALIÇAS	2
2.2 CULTURA DA COUVE FOLHA	3
2.3 PODRIDÃO NEGRA – <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	5
2.4 MANCHA DE ALTERNARIA – <i>Alternaria brassicae</i>	7
2.5 CONTROLE DE DOENÇAS EM COUVE FOLHA.....	8
2.6 CONTROLE ALTERNATIVOS DE DOENÇAS DE PLANTA	10
2.6.1 Indução de resistência	10
2.6.2 Extratos de plantas	14
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO I - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FORMULADOS A BASE DE ALECRIM CONTRA <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> E <i>Alternaria brassicae</i>.....	28
1 RESUMO	28
2 ABSTRACT	28
3 INTRODUÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS.....	30
4.2 FORMULADOS A BASE DE ALECRIM	31
4.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i>	31
4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i>	32
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	33
5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	35
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II - FORMULADOS A BASE DE ALECRIM PARA CONTROLE DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> EM COUVE FOLHA	43

1	RESUMO	43
2	ABSTRACT	44
3	INTRODUÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	PATÓGENO E TRATAMENTOS	46
4.2	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	47
4.3	ANÁLISE BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	48
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM COUVE FOLHA À <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> UTILIZANDO OS FORMULADOS DE <i>R. officinalis</i>	49
5.2	BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	52
6	CONCLUSÃO	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO III - FORMULADOS A BASE DE <i>Rosmarinus officinalis</i> PARA O CONTROLE DE <i>Alternaria brassicae</i> EM FOLHAS DE <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>..		
1	RESUMO	63
2	ABSTRACT	64
3	INTRODUÇÃO	65
4	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1	PATÓGENO E TRATAMENTOS	66
4.2	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	67
4.3	ANÁLISE BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	68
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	70
5.2	BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	74
6	CONCLUSÃO	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO GERAL

As hortaliças que compreendem a família Brassicaceae desempenham importante papel sócio econômico no Brasil, fornecendo alimento e gerando emprego e renda à população. A couve folha (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) é uma das principais espécies comerciais do grupo e seu consumo vem aumentando no Brasil, provavelmente em função da busca por alimentos ricos em nutrientes e vitaminas, e ainda por suas propriedades nutricionais e medicinais.

Entretanto, o aumento das áreas de cultivo em função do consumo, o modelo de sistema de produção e as diferentes condições edafoclimáticas no Brasil favorecem a ocorrência de problemas fitossanitários nos cultivos. Dentre as principais doenças da couve folha têm-se a podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e a mancha de alternaria causada pelo fungo *Alternaria brassicae*, as quais ocasionam danos e redução no seu valor de mercado.

Nos sistemas de cultivo de couve folha o controle fitossanitário mais usual é por meio de aplicações de agrotóxicos, entretanto, este tem-se mostrado pouco eficiente, uma vez que instalados os patógenos nas áreas de cultivo, torna-se difícil sua erradicação pela facilidade na disseminação e sobrevivência. Considera-se ainda, problemas causados pelo uso de agrotóxicos como contaminação de alimentos e meio ambiente, intoxicação de produtores, desequilíbrio biológico pela supressão de organismos benéficos, resistência de patógenos aos produtos, entre outros.

Diante deste cenário, vem sendo estudadas estratégias de controle que possam ser inseridas no manejo fitossanitário de forma eficiente e mais sustentável. Uma das alternativas é a proteção das plantas contra doenças pela indução de resistência, que pode ser conseguida com a aplicação de produtos de origem biótica (como extratos de plantas medicinais) ou abiótica (como produtos derivados do ácido salicílico), que levam à ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta e, por conseguinte, minimizam os danos causados pelas doenças, principalmente em áreas de cultivo orgânico, especialmente em couve folha, na qual a parte consumida é na forma *in natura*.

Neste contexto, os extratos de plantas medicinais vêm sendo pesquisados, no intuito de explorar suas propriedades antibacterianas e antifúngicas e/ou indutoras de resistência, como é o caso do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Este potencial do alecrim no controle de doenças vem se revelando em função dos seus princípios ativos como pineno, acetato de bornilha, cânfora, cineol, borneol e verbenona, que possuem ação antimicrobiana

(GONZÁLEZ-MICHEL, 2013) e indutora de resistência (LORENZETTI et al., 2018). Apesar dos estudos realizados, ainda muito precisa ser pesquisado para elucidar a eficiência dos formulados a base de alecrim contra fitopatógenos, como por exemplo, como atuam na indução de resistência, doses e número de aplicações, dentre outros.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e indutora de mecanismos de resistência em couve folha contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae* a partir de formulados químico e orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DAS HORTALIÇAS

As hortaliças ocupam lugar de destaque no cenário agrícola brasileiro em função de sua alta rentabilidade, distribuição de renda e geração de empregos. A olericultura é importante para a atividade agrícola, contribuindo para o seu fortalecimento e sustentabilidade, pois a sua produção geralmente é feita por agricultores familiares, uma vez que esse tipo de cultivo utiliza pouco espaço, justamente por ter um ciclo bastante curto (RODRIGUES, 2019; FONTES, 2021).

A Confederação da Agricultura e Pecuária (CNA, 2017) afirma que a produção de hortaliças no Brasil gera cerca de 13 milhões de empregos diretos e indiretos, em uma área de pouco mais de 5 milhões de hectare e com uma produção média de 37 milhões de toneladas anuais. O cultivo de hortaliças no Brasil é uma atividade agroeconômica realizada por micro, pequenas, médias e grandes propriedades localizadas tanto no interior, quanto nas proximidades dos grandes centros urbanos (FIGUEIREDO, 2015). A maior parte da produção (60%) concentra-se nas regiões Sul e Sudeste em propriedades de exploração familiar com menos de 10 hectares, os quais são utilizados intensivamente (SILVA et al., 2015).

O estado do Paraná, na safra de 2020, produziu 2,9 milhões de toneladas, em 117,8 mil hectares, movimentando aproximadamente R\$ 5 bilhões (DERAL, 2020). No estado os produtores de hortaliças são essencialmente familiares, sendo a área média de cada propriedade de aproximadamente 3 hectares. A atividade está presente em cerca de 13% das 300 mil propriedades familiares existentes no Paraná (EMATER, 2016).

A característica mais marcante da atividade é o fato de ser uma atividade agroeconômica altamente intensiva em seus mais variados aspectos, em contraste com outras atividades agrícolas extensivas. Em contrapartida, possibilita a obtenção de elevada produção

e altos rendimentos bruto e líquido, por hectare cultivado e por hectare/ano (FONTES, 2021). No entanto, é uma atividade de alto risco, em função de eventos adversos, abióticos e bióticos.

Em muitos agroecossistemas, as hortaliças tornam-se componente chave para a diversificação, uma vez que a atividade apresenta algumas características próprias que a diferenciam das demais culturas, como o ciclo cultural curto, o que permite vários plantios com a mesma espécie ou sucessão com outras espécies. Adicionalmente, demanda elevada mão de obra, diversidade de produtos, retorno econômico rápido e a área ocupada por ciclo de cultivo é variável dependendo da espécie, além do aproveitamento de terrenos de baixa fertilidade e problemáticos (FILGUEIRA, 2008).

A diversificação da produção é uma forma eficiente de favorecer a comercialização e possibilitar maior segurança econômica (FILGUEIRA, 2008). Desse modo, a produção de hortaliças é a atividade que mais se identifica como opção de comercialização para os agricultores familiares, em virtude principalmente de demandar mão de obra familiar e existir diferentes canais de mercado, pois são normalmente comercializadas em mercados, feiras livres e quitandas, entre outros (FONTES, 2021).

Em geral, os produtos hortícolas são comercializados predominantemente *in natura* ou minimamente processados e tem forte apelo visual, tornando o consumidor um elo importante das cadeias produtivas (MELO; FABRI, 2017). O processamento mínimo de hortaliças é uma alternativa viável e válida para a redução de danos pós-colheita, bem como agregação de valor ao produto (FILGUEIRA, 2008).

Dentre as espécies cultivadas e consumidas tem-se *Brassica oleracea*, a de maior importância, que possui as seguintes variedades botânicas: repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócolis (*B. oleracea* var. *italica*), couve chinesa (*B. rapa* var. *pekinensis*) e couve folha (*B. oleracea* L. var. *acephala*) (MELO et al., 2019; VIDIGAL; PEREIRA, 2021). Entretanto, couve folha se destaca por sua área, volume de produção, facilidade de propagação, aumento de consumo atrelado às diversas formas de utilização na culinária e, mais recentemente, as descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutricionais e medicinais (TRANI et al., 2015).

2.2 CULTURA DA COUVE FOLHA

Brassicaceae constitui uma das famílias botânicas mais numerosas, possuindo cerca de 4.000 espécies que estão inseridas em mais de 400 gêneros (AVATO; ARGENTIERI, 2015; FILGUEIRA, 2008). Muitas dessas espécies são economicamente importantes, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Brassica*. A espécie *Brassica oleracea* é de origem europeia e

compreende um grupo diversificado de espécies, cultivadas em todo o mundo, as quais se adaptam a uma vasta gama de condições climáticas (RODRIGUEZ et al., 2015; VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

A couve folha (*B. oleracea* L. var. *acephala*) caracteriza-se como uma planta herbácea arbustiva anual ou bienal, de caule ereto, cilíndrico, liso e carnoso, porém não intumescido, com altura variando entre 40 a 120 cm. O ápice do caule emite novas folhas continuamente, que são pecioladas, espessas e pouco carnosas, com limbo bem desenvolvido, arredondado, ceroso e coloração verde claro a escuro. Possui pecíolo longo e nervuras bem destacadas. As folhas distribuem-se ao redor do caule e de suas axilas surgem brotações. Como consta no seu nome científico a planta não forma “cabeça” (FILGUEIRA, 2008; VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

A couve folha é uma das brássicas mais cultivadas e consumidas mundialmente (FERNANDES et al., 2009). No Brasil, ela representa parcela significativa da produção de hortaliças, sobretudo nas regiões sudeste e sul do país (VIDIGAL; PEREIRA, 2021). No Estado do Paraná, anualmente são produzidas cerca de 29 mil toneladas de couve folha em uma área de aproximadamente 1.200 hectares (DERAL, 2020). A espécie, comumente cultivada por agricultores familiares em pequenas propriedades, apresenta rápido retorno econômico, custo relativamente baixo comparado com outras hortaliças, alta lucratividade e elevado uso de mão de obra, principalmente na fase de colheita (SILVA et al., 2012).

A cultura desenvolve-se melhor em regiões de clima ameno, sendo resistentes a geadas e tem boa tolerância ao calor, o que possibilita o seu cultivo em regiões mais quentes e durante todo o ano. Temperaturas médias entre 16 a 22 °C favorecem a produção, temperaturas mínimas entre 5 a 10 °C por mais de 30 dias favorecem o florescimento e temperaturas acima das recomendadas podem provocar prejuízos no desenvolvimento das plantas (FILGUEIRA, 2008; VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

A colheita inicia-se em torno de 60 dias, mas as folhas melhores para a comercialização são as colhidas a partir dos 80 a 90 dias, no qual a produtividade média é de 3 a 4 Kg de folhas por planta de couve por mês (VIDIGAL; PEREIRA, 2021). As folhas de couve geralmente são comercializadas em maços ou na forma minimamente processada (picadas e embaladas). Na comercialização, aspectos da aparência como tamanho, forma, brilho e cor da folha, principalmente, são um dos principais atributos de qualidade observado pelo consumidor (NOVO et al., 2010).

Comparativamente às outras hortaliças folhosas, a couve folha destaca-se pelo teor de glucosinolatos, atividade antioxidante, compostos fenólicos, proteínas, carboidratos, fibras,

cálcio, ferro, vitaminas (A, E, D, K) e niacina, além disso, é uma excelente fonte de vitamina C, apresentando teores maiores que nos citros (BAENAS; MORENO; GARCIA-VIGUERA, 2012; VIDIGAL; PEREIRA, 2021). Tais atributos do valor nutricional da couve folha chamam a atenção do consumidor e, conseqüentemente, causam aumento gradativo do consumo, estimulado sobretudo pela procura por uma dieta saudável e balanceada, novas maneiras de sua utilização na culinária e recentes descobertas da ciência quanto as suas propriedades nutracêuticas (NOVO et al., 2010).

A expansão desse consumo e, por conseguinte, da produção de couve folha e de outras brássicas nas áreas cultivadas, tem intensificado diversos problemas fitossanitários, especialmente de origens bacteriana e fúngica, que causam lesões nas folhas, limitando a produção e ocasionando danos e redução do seu valor de mercado, tornando assim, uma atividade de alto risco. Dentre as doenças que ocorrem em cultivos de couve folha destacam-se a podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e a mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria brassicae* (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

2.3 PODRIDÃO NEGRA – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

X. campestris pv. *campestris* - *Xcc* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Xanthomonadales* e família *Xanthomonadaceae*, sendo uma bactéria patogênica para brássicas, causando a doença podridão negra (BEDENDO; BELASQUE, 2018). O gênero *Xanthomonas* compreende bactérias gram-negativas, móveis com um único flagelo polar, aeróbicos obrigatórios, formando geralmente colônias brilhantes, viscosas, de bordos lisos, reconhecidas pela presença da coloração amarela intensa, resultante da produção de pigmentos conhecidos por xanthomonadinas (BEDENDO; BELASQUE, 2018).

Mundialmente distribuída, epidemias de podridão negra em regiões tropicais, quentes e úmidas são, em geral, mais severas e podem promover consideráveis reduções de produtividade e de qualidade do produto, devido às lesões nas folhas (LEMA et al., 2012; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

A penetração da bactéria na planta ocorre principalmente pelos hidatódios, que são aberturas naturais semelhantes a poros, encontrados nos bordos foliares. Por essas estruturas ocorre o processo de gutação, pelo qual a planta elimina o excesso de água na forma de gotas nos bordos das folhas tornando-se veículos de entrada da bactéria (BEDENDO; BELASQUE, 2018). Além das aberturas naturais, os ferimentos presentes na parte aérea podem constituir-se portas de entrada da bactéria na planta (WULFF, 2008; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

O processo de infecção começa quando gotículas de gutação contaminadas com a bactéria são reabsorvidas para dentro da folha, levando a suspensão bacteriana para dentro do sistema vascular através da cavidade dos hidatódios. As condições ótimas para a penetração da bactéria são temperaturas entre 28 a 30 °C e presença de água livre na superfície das plantas (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Ao penetrar pelos hidatódios, *Xcc* é capaz de colonizar os vasos do xilema e do parênquima mesofílico da planta, sendo o tempo estimado para o aparecimento dos sintomas da podridão negra de dez a 14 dias após penetração no tecido (WILLIAMS, 2007; RYAN et al., 2011).

Os sintomas da podridão negra podem ser observados em qualquer estágio fenológico de desenvolvimento das plantas, e se caracterizam por lesões amareladas nas margens das folhas em formato de “V”, com vértice voltado para o centro da folha. Os tecidos afetados podem se tornar necróticos, e folhas podem cair prematuramente, além disso, em alguns casos, a bactéria pode penetrar pelos estômatos do limbo foliar e dar origem a lesões necróticas irregulares (VELASCO et al., 2013; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). O escurecimento da nervura também pode ser observado, resultante da colonização do sistema vascular (WILLIAMS, 2007).

A podridão negra se desenvolve com maior intensidade em regiões onde predomina clima quente e úmido, nas regiões tropicais, subtropicais e continentais úmidos, pois temperaturas entre 25 a 35 °C e umidade elevadas do ar (80% a 100%) e no solo, favorecem a doença (FILGUEIRA, 2008; VICENTE; HOLUB, 2013), levando a uma redução considerável de 50% a 60% no rendimento (DHAR; SINGH, 2014). Em climas frios a doença também ocorre, porém raramente evolui a ponto de destruir toda a planta (WILLIAMS, 2007). *Xcc* pode sobreviver em restos culturais, em plantas de brássicas doentes remanescentes no campo, em plantas daninhas especialmente da família *Brassicaceae* (como *Coronopus didymus* e *Raphanus raphanistrum*) e na superfície e/ou no interior de sementes (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

A disseminação da bactéria a curtas distâncias é realizada através de aerossóis, insetos, água de irrigação, chuva e equipamentos agrícolas, durante os tratos culturais, e a longas distâncias é feita principalmente por sementes ou mudas de brássicas infectadas (WULFF, 2008; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Na produção de mudas, o sistema de irrigação pode aumentar significativamente a propagação da bactéria e pode levar a um alto nível de inóculo inicial da doença no campo (VICENTE; HOLUB, 2013). O controle de *Xcc* é difícil, assim a melhor forma de prevenção da doença é o emprego de material vegetativo isento do patógeno e manejo da cultura no campo.

2.4 MANCHA DE ALTERNARIA – *Alternaria brassicae*

O gênero *Alternaria* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Dothideomycetes*, ordem *Pleosporales* e família *Pleosporaceae* (MASSOLA JÚNIOR, 2018). O gênero apresenta grande número de espécies, com mais de 40 delas relatadas como patogênicas de plantas (SIMMONS, 2007). Espécies fitopatogênicas são de ocorrência mundial, causando danos consideráveis, desde a fase de plântulas até a fase reprodutiva das plantas, sendo que as principais espécies de fungos que infectam as plantas da família Brassicaceae são *A. brassicicola* e *A. brassicae* (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Uma característica comum, observada em algumas espécies de *Alternaria*, está na baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

A espécie *A. brassicae* caracteriza-se por apresentar micélio septado, cinza claro, com conidióforos longos e septados, com conídios terminais, multinucleados, comprimento entre 44 µm a 55 µm e 11 µm a 16 µm de largura, com nenhum ou até quatro septos longitudinais e cinco a oito transversais, de forma clavada, com apêndice, formados em cadeia ou isolados (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; DIOGO et al., 2017).

A mancha de alternaria causada por *A. brassicae* é considerada a doença fúngica mais comum de couve folha e altamente destrutiva, e pode causar danos consideráveis (6% até 100%), desde a fase de viveiro até a fase reprodutiva da planta e, conseqüentemente, afetando a qualidade do produto, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

A penetração do fungo ocorre quando os conídios germinam e infectam as plantas, podendo penetrar diretamente pela cutícula, por ferimentos ou através dos estômatos (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015; AMORIM; PASCHOLATI, 2018). Toda a parte aérea da planta hospedeira está sujeita a infecção e para que ocorra há necessidade de, pelo menos, 9 horas de água livre na superfície da planta para que ocorra a germinação, infecção e esporulação (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

A colonização é intercelular, invadindo tecidos do hospedeiro e provocando alterações em diversos processos fisiológicos, que se exteriorizam na forma de sintomas (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015). Os sintomas aparecem entre dois a 14 dias após a infecção, dependendo da suscetibilidade da variedade. Em condições de campo, as lesões surgem de três a cinco dias após a inoculação, e, em condições controladas, pontuações negras podem ser verificadas 24 h após a inoculação (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

Os sintomas podem ser observados tanto na fase de sementeira, bem como, nas plantas adultas. As sementes infectadas apresentam redução da germinação, resultando em *damping-off* antes e após a emergência. Nas plântulas, os sintomas variam entre necrose do cotilédono e hipocótilo, até *damping-off*. Plântulas nessas condições frequentemente morrem, caso sobrevivam, apresentam-se enfezadas. Nas plantas adultas, os sintomas iniciais ocorrem nas folhas mais externas e, posteriormente, em todas as folhas, nas quais se iniciam como pequenas manchas escuras que gradualmente aumentam e se tornam circulares, concêntricas e com halo amarelado (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Ataques severos podem ocasionar intensa desfolha e manchas necróticas no caule e na inflorescência (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

A doença pode apresentar alto poder destrutivo em condições de altas temperaturas (25 a 32 °C) e umidade relativa do ar de 40% durante o dia e 95% durante a noite. As temperaturas mínimas, ótimas e máximas necessárias para a germinação dos conídios são 5 a 7, 25 a 27 e 30 a 32 °C, respectivamente. A esporulação abundante do fungo ocorre na faixa de 14 a 26 °C, com umidade relativa de 100% durante 24 horas (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

As principais fontes de inóculo de *A. brassicae* são sementes contaminadas, restos culturais infectados, plantas daninhas, plantas voluntárias, além da vasta gama de plantas hospedeiras cultivadas. A disseminação do patógeno ocorre principalmente pelas sementes, mudas infectadas e pelo vento (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). Além dessas formas de disseminação, trabalhadores, equipamentos e animais em contato com as folhas molhadas podem disseminar o fungo (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015). A medida que a população de *A. brassicae* aumenta nas áreas de cultivo torna-se difícil seu controle.

2.5 CONTROLE DE DOENÇAS EM COUVE FOLHA

No contexto da produtividade, o controle de doenças não pode ser abordado isoladamente, mas integrado a todos os outros fatores que interferem na produção como o clima, variedade, adubação, tratos culturais, plantas daninhas e pragas, entre outros (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

De maneira geral, o controle de doenças em couve folha é realizado por práticas de manejo que incluem rotação de culturas, remoção de restos culturais de brássicas, eliminação de plantas daninhas, tratamentos de sementes, emprego de sementes e mudas saudáveis e uso de cultivares resistentes e precoces (VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

O controle das doenças é muito difícil e só pode ser alcançado com o uso de sementes livres dos patógenos e adoção de práticas culturais adequadas e eliminação de outras fontes potenciais de inóculo (SAHA et al., 2016). O tratamento de sementes é altamente recomendado, pela imersão das sementes em água quente, utilização de antibióticos, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, peróxido de hidrogênio ou acetato cúprico, mas nenhum tratamento é totalmente eficaz (VICENTE; HOLUB, 2013; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

Pesquisas desenvolvidas nos Estados Unidos demonstram que a infecção máxima tolerável em sementes de brássicas é de 0,01% (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016). O tratamento térmico de sementes de brássicas é uma alternativa para o controle das doenças, que consiste na imersão de sementes em água a 50 °C por 25 a 30 minutos, sendo eficiente para a remoção de patógenos quando presentes na superfície das sementes (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; VIDIGAL; PEREIRA, 2021). No Brasil, estudos com tratamento térmico em sementes tratadas deram origem a menos de 2% de plantas com sintomas de podridão negra, enquanto as sementes que não receberam o tratamento originaram 70% de plantas com sintomas (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

Outras medidas para o manejo eficiente das doenças são a incorporação de restos culturais de brássicas ao solo, rotação de culturas, limpeza de máquinas e equipamentos, eliminação de plantas voluntárias e de plantas daninhas hospedeiras do patógenos e adotar sistema de irrigação que não promova o molhamento foliar (HALFELD-VIEIRA; NECHET; ARAÚJO, 2010; VICENTE; HOLUB, 2013; MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; VIDIGAL; PEREIRA, 2021). Em áreas anteriormente cultivadas com brássicas, é aconselhável a rotação de culturas por um período de dois a três anos com espécies não-hospedeiras dos patógenos devido a capacidade de sobrevivência em restos culturais (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; SILVA JÚNIOR et al., 2020).

Entretanto, a forma mais eficiente de controle é a utilização de cultivares resistentes e precoces (SAHA et al., 2016; VIDIGAL; PEREIRA, 2021). Assim, o plantio de cultivares e/ou híbridos de brássicas com níveis de resistência tem sido uma das estratégias mais econômicas e eficazes (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016; AFRIN et al., 2018). No entanto, o controle das doenças é complicado, uma vez que existem poucas variedades resistentes disponíveis no mercado (SAHA et al., 2016) e adaptadas a todas as regiões de cultivo.

Frente aos inúmeros métodos de controle das doenças, o mais usual no sistema de cultivo convencional de couve folha, é por aplicações periódicas de fungicidas e/ou bactericidas, principalmente químicos. Os fungicidas e/ou bactericidas incluem uma grande

variedade de compostos que agem de forma preventiva, protetora ou curativa contra os patógenos, fonte de inóculo e planta hospedeira (SILVA et al., 2019). Para couve folha não há nenhum produto registrado no sistema on-line Agrofit do Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA (2021) para o *X. campestris* pv. *campestris*. Para o controle de *A. brassicae* em couve folha estão registrados no sistema on-line Agrofit do MAPA os seguintes princípios ativos: mancozebe, tebuconazol e trifloxistrobina, e extrato de folhas de *Melaleuca alternifolia*.

A aplicação contínua destes compostos no ambiente que já abriga estirpes resistentes dos patógenos ameaça a viabilidade da cultura e não oferece uma solução satisfatória e durável (LAMICHHANE et al., 2018; SILVA JÚNIOR; BEHLAU, 2018). Torna-se imprescindível investigar métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio do ecossistema (ROMEIRO, 2008). O uso de produtos alternativos pode representar uma importante estratégia para o manejo das doenças no cultivo de couve folha, com possibilidades de reduzir o uso de agrotóxicos e produzir folhas comercialmente mais aceitáveis.

2.6 CONTROLE ALTERNATIVOS DE DOENÇAS DE PLANTA

Controle alternativo de doenças é aquele que inclui o biológico e a indução dos mecanismos de resistência das plantas (MORAES, 1992), além do uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e/ou indutores de resistência (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008). A exploração da atividade biológica de compostos secundários, presentes no extrato bruto de plantas medicinais, ao lado da indução de resistência é mais uma forma potencial de controle alternativo (SCHWAN-ESTRADA et al., 2012).

2.6.1 Indução de resistência

A indução de resistência em plantas envolve a ativação dos mecanismos latentes de defesa através de tratamentos com agentes externos, sejam eles de natureza biótica (microrganismos) ou abiótica (como acibenzolar-S-metil, entre outros) (PASCHOLATI; DALIO, 2018), sem alteração do genoma da planta (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Trata-se de uma forma de defesa natural, no qual as plantas possuem a capacidade de reconhecer moléculas derivadas do patógeno, as quais ativam resposta de resistência rápida e direta, atuando de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados e com magnitude adequada (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008; PASCHOLATI; DALIO, 2018). Esse reconhecimento pode resultar em

respostas bioquímica, fisiológica ou mudanças morfológicas na planta, atrasando ou evitando a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (LORITO et al., 2010; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Portanto, a ativação das respostas de defesa por parte da planta se inicia após o reconhecimento por receptores específicos, de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que resulta na ativação de genes de mecanismos de defesa vegetal mediada por intensa sinalização celular (CAMARGO, 2018).

A indução de resistência pode se manifestar de maneira local ou sistemicamente, ou seja, à distância do ponto de aplicação do indutor e penetração do patógeno, pois sinais podem ser translocados para partes distantes do sítio onde o reconhecimento ocorreu, aumentando os níveis de resistência (PASCHOLATI; DALIO, 2018). A proteção sistêmica em plantas se divide em resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR) e resistência sistêmica induzida (*induced systemic resistance* – ISR) (FU; DONG, 2013).

A SAR, induzida geralmente por agentes bióticos (patógenos necrotróficos) e abióticos, é controlada por um caminho de sinalização dependente do acúmulo de ácido salicílico (AS) e da proteína de regulação NPR1 (WANG et al., 2018; PASCHOLATI; DALIO, 2018), resultando na expressão de proteínas antimicrobianas, cuja ação confere resistência da planta a patógenos de amplo espectro (SPOEL; DONG, 2012). A RSI, promovida por bactérias não-patogênicas e promotoras de crescimento (rizobactérias), é regulada por ácido jasmônico e etileno, porém requer proteína NPR1 (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Assim, após a percepção por parte da planta de microrganismos na rizosfera, estas respondem de acordo, amortecendo as defesas quando colonizadas por microrganismos benéficos ou aumentando as defesas contra os patógenos (WANG et al., 2020). Tanto no caso de SAR como de ISR, um sinal é gerado no sítio de contato entre o indutor biótico e o órgão vegetal, sinal esse que se transloca para outros órgãos, desencadeando eventos que culminam com a ativação de genes de resistência (ROMEIRO, 2008).

A proteção induzida em plantas envolve a ativação de mecanismos de resistência representados por barreiras estruturais e bioquímicas (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016). Os fatores estruturais atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada e a colonização dos tecidos, enquanto as reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Os mecanismos estruturais e bioquímicos são subdivididos em pré-formados (passivos, constitutivos), que

incluem aqueles já presentes na planta antes do contato com os patógenos, e os pós-formados (ativos, induzíveis) que se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis na planta antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta a presença dos patógenos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Tais mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chave nos metabolismos primário e secundário (STANGARLIN et al., 2011a). As alterações nas atividades dessas enzimas chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (MACAGNAN et al., 2008). Entre essas, estão peroxidases, fenilalanina amônia-liase (LINTHORST; VAN LOON, 2008) e polifenoloxidasas (CONSTABEL; RYAN, 1998).

A enzima peroxidase de guaiacol (E. C. 1.11.1.7), ocorre em tecidos de plantas, em certas células animais e microrganismos, e participa de vários processos fisiológicos de grande importância (HIRAGA et al., 2001; HOAGLAND, 2002). Van Loon, Rep; Pieterse (2006), classificaram-nas como proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis related proteins* - Proteínas-PR) pertencentes a família PR-9. Nas plantas, as peroxidases existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares (BARBOSA et al., 2014), e podem estar localizados principalmente na parede celular e no vacúolo (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

As peroxidases participam de vários mecanismos de defesa das plantas: catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), originando lignina (STANGARLIN et al., 2011a); participa da biossíntese do hormônio vegetal de etileno (ISHIGE et al., 1993); da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção (FRY, 1986); oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 2002); reforço das paredes celulares a partir da formação de lignina (PASCHOLATI; DALIO, 2018), suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina; sinalização (BOWLES, 1990; WOJTASZEK, 1997) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que apresentam ação antimicrobiana (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

A polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.2) agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas, constituindo uma atividade de difenolase (YORUK; MARSHALL, 2003). São enzimas intracelulares que podem ocorrer em animais, plantas e em várias espécies de bactérias e fungos (MAYER; HAREL, 1979). Nas plantas, estão geralmente distribuídas em toda sua estrutura, podendo alguns

órgãos/tecidos terem maiores concentrações, bem como, o nível pode variar em função da espécie ou cultivar (MAYER; HAREL, 1979), e do ambiente (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995), podendo sua expressão ser induzida ou inibida em algumas plantas por estresses como injúrias, teor de nitrogênio e ataque de patógenos (SÁNCHEZ et al., 2000). A expressão de genes que codificam polifenoloxidase é altamente correlacionada com a ativação da via sinalizadora dos octadecanóides, indicando que esta rota regula a expressão destas enzimas (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995).

As polifenoloxidases permanecem intracelularmente, em sua grande maioria em estado inativado, dentro dos tilacóides nos cloroplastos, separados dos compostos fenólicos, que estão compartimentalizados nos vacúolos, mas pequena parte pode estar extracelularmente na parede celular (MAYER; HAREL, 1979; VAUGHN; LAX; DUKE, 1988). À medida que ocorre a ruptura da célula ocasionada por ferimentos, ação de insetos, patógenos, ou ainda, senescência, as polifenoloxidase são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

No processo de defesa celular, ou seja, na ação contra fitopatógenos, a enzima é descompartimentalizada dos tilacóides após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas, que apresentam ação antimicrobiana (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004). De acordo com Mohammadi e Kazemi (2002) as polifenoloxidases participam do processo de lignificação durante a invasão do patógeno.

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) é enzima do metabolismo secundário, sendo encontrado principalmente em plantas superiores, mas também está presente em algumas bactérias (XIANG; MOORE, 2005), e fungos, mas não em animais (RÖSLER et al., 1997). Nas plantas, é localizada principalmente dispersa no citoplasma das células em geral, embora possa estar associado a organelas membranosas (JONES, 1984; DIXON; PAIVA, 1995).

A fenilalanina amônia-liase é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, proveniente da rota do ácido chiquímico, convertendo-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia, o qual representa o primeiro fenilpropanoide chave nas vias de síntese de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides (SARMA; SREELAKSHMI; SHARMA, 1998; GERASIMOVA; PRIDVOROVA; OZERETSKOVSKAYA, 2005). O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonoides e ligninas (STANGARLIN et al., 2011a).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de numerosos compostos fenilpropanoides que realizam várias funções essenciais na planta (RITTER; SCHULZ, 2004). Estes compostos incluem lignina e fitoalexinas isoflavonoides, ambos envolvidos nas reações de defesa das plantas (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989). A fenilalanina amônia-liase gera precursores de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção, como a lignina (ALMEIDA et al., 2012). De acordo com Camm e Towers (1975), por ser muito sensível ao estado fisiológico das plantas e devido à grande variedade de estímulos, a atividade desta enzima pode variar muito, em pouco tempo.

A ativação das defesas das plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008; LUCAS et al., 2012; NAZ et al., 2014; KOBAYASHI; AMARAL, 2018; KRZYZANIAK et al., 2018), preparações de leveduras (ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009; STANGARLIN et al., 2010; SOUZA et al., 2019), exopolissacarídeos bacterianos (KYUNGSEOK; KLOEPPER; RYU, 2008; JETIYANON; PLIANBANGCHANG, 2013; BLAINSKI et al., 2017), preparados homeopáticos (TOLEDO; STANGARLIN; BONATO, 2011; TOLEDO; STANGARLIN; BONATO, 2015) e rizobactérias promotoras de crescimento (REZENDE et al., 2021), entre outros.

2.6.2 Extratos de plantas

Os extratos vegetais vêm sendo estudados e utilizados nos últimos anos para o controle ou manejo de doenças de plantas devido à presença de substâncias que podem apresentar ação biológica diretamente contra os patógenos ou induzir resistência, nas plantas em que são aplicados, contra uma ampla gama de patógenos (STANGARLIN et al., 2011b). A principal vantagem relacionada ao uso de extratos vegetais em proteção de plantas, quando comparados aos produtos sintéticos, deve-se ao fato de gerar novos compostos, os quais os patógenos não se tornaram capazes de inativar, além de serem menos tóxicos, serem degradados rapidamente pelo ambiente, possuírem um amplo modo de ação e de serem derivados de recursos renováveis (FERRAZ; LOPES; AMORA, 2008).

As plantas medicinais possuem uma grande riqueza química com princípios ativos, tornando-se fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos (STEVANOVIĆ et al., 2018). Esses compostos pertencem a várias classes distintas de substâncias químicas, como alcaloides, terpenos, ligninas, flavonoides, cumarinas, benzenoides, quinonas, xantonas, lactonas e esteroides, entre outros (STASI, 1997).

Nas plantas os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos no crescimento ou reprodução, mas frequentemente estão envolvidos na defesa da mesma, sendo sintetizados através das vias metabólicas secundárias da planta (VERPOORTE, 1998; BAKKALI et al., 2008). Esses compostos geralmente pertencem a uma das três grandes classes químicas: terpenos, nitrogenados e fenólicos. Os terpenos são sintetizados a partir da acetil-CoA, via rota do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerado, no cloroplasto. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Já os compostos fenólicos são produzidos principalmente pelas vias do ácido chiquímico ou ácido mevalônico e incluem uma ampla variedade de compostos relacionados à defesa, como os flavonoides, antocianinas, várias fitoalexinas, taninos, lignina e furanocumarinas (PERES, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Na rota do ácido chiquímico a fenilalanina representa importante ponto de partida para a produção da maioria dos compostos fenólicos (BORGES; AMORIM, 2020).

Neste sentido, diversas pesquisas têm sido realizadas para identificar plantas cujo extrato bruto apresente substâncias com ação biológica contra fitopatógenos e/ou indutora de resistência (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008; STANGARLIN et al., 2011b; VENTUROSU et al., 2011; BRITO; NASCIMENTO, 2015; SADANA; DIDWANIA, 2015; MOURA; JASKI; FRANZENER, 2016; SANTOS NETO et al., 2016; COSTA et al., 2019).

Moura et al. (2012) controlaram a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em maracujá-amarelo usando extrato bruto aquoso de *Cymbopogon citratus* (capim-limão). Peixinho et al. (2017) observaram o controle da podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) da uva pelos extratos vegetais de *Vernonia condensata* (boldo baiano), *Mimosa tenuiflora* (jurema preta), *Bauhinia forficata* (pata de vaca) e *Caesalpinia ferrea* (pau-ferro). Kobayashi e Amaral (2018) observaram o controle de *Alternaria solani* na cultura do tomateiro pelos extratos *Vernonia polysphaera* (assa peixe) e *Schinus polygama* (aroeirinha).

Almeida, Moura e Franzener (2017) avaliaram o efeito protetor dos extratos das plantas *Zingiber officinale* (gingibre) *Caryophyllus aromaticus* (cravo-da-índia) e *Allium sativum* (alho) no controle da pinta preta do tomateiro. Todos os tratamentos inibiram o crescimento micelial diferindo da testemunha, a água destilada. Para os extratos de gengibre e alho na concentração de 20% a inibição foi de 37,9% e 70%, respectivamente. A calda bordalesa (tratamento padrão) proporcionou 100% de inibição do crescimento micelial. O extrato de cravo-da-índia promoveu inibição de 100% no crescimento micelial em todas as concentrações,

indicando elevado efeito antifúngico sobre *A. solani* mesmo em baixas concentrações. Quanto a severidade, todos os tratamentos promoveram reduções na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de 55,8%, 29,5% e 22,5% para os extratos de cravo-da-índia, alho e gengibre em relação a testemunha, respectivamente.

Entre as plantas utilizados no controle de doenças têm-se destacado o alecrim, que vem sendo amplamente pesquisado por possuir princípios ativos com ação antimicrobiana. *Rosmarinus officinalis*, conhecida comumente como alecrim, pertence à família Lamiaceae, originária do Mediterrâneo, cultivada em altitudes de até 1.500 metros e suportando temperaturas de -10 °C (GONZÁLEZ-MICHEL, 2013; RUPPELT et al., 2015).

R. officinalis é uma planta pequena de porte subarborescente lenhoso e altamente ramificado, de 1 a 2 metros de altura. As suas folhas são pequenas, sésseis, finas, opostas, lanceoladas, e apresentam dois tons de verde, na parte superior verde-escuro e na inferior verde acinzentado. As flores são azulado-claras, pequenas e de aroma forte e nascem em buquês na junção do caule com a folha. O fruto mede aproximadamente 1 mm e aparece dentro do cálice na forma de quatro pequenos nozes marrons (GONZÁLEZ-MICHEL, 2013).

O alecrim apresenta uma ampla gama de compostos como os fenólicos, terpenos, terpenoides e fenilpropanoides. Os compostos fenólicos com ação antioxidante são os diterpenos fenólicos como ácido carnosólico, carnosol, rosmanol, ácido rosmarínico, epirosmanol, 7-metil-epirosmanol, metil carnosato e ácido cafeico (CARVALHO JÚNIOR., 2005); os terpenos e terpenoides são cânfora, 1,8-cineol, α -pineno, canfeno, α -terpineol, limoneno, β -cariofileno, mirceno, α -terpineol, verbenol, verbenona e borneol (GONZÁLEZ-MICHEL, 2013; BORGES et al., 2019). Existem outras substâncias presentes no alecrim como taninos, saponinas, alcaloides e flavonoides (luteolina, apigenina e diosmetina) (GONZÁLEZ-MICHEL, 2013). Os compostos pinenos, 1,8-cineol, borneol, canfeno e cânfora têm atividade antimicrobiana, possuindo a capacidade de interferir em distintas atividades da célula microbiana, eliminando ou inibindo o crescimento dos mesmos (RIBEIRO et al., 2012).

O potencial de alecrim para o controle de patógenos tem sido verificado em diversos patossistemas, como *Pseudocercospora vitis* e *Plasmopara viticola* em videira (MAIA et al., 2014). Brand et al. (2010) observaram indução da fitoalexina faseolina em feijoeiro, com o uso de extrato aquoso de alecrim e sua fungitoxidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. As fitoalexinas constituem um grupo muito importante de metabólitos secundários com elevado potencial antimicrobiano (TAIZ; ZEIGLER, 2009).

Lee et al. (2020) observaram efeito fungicida sobre *Aspergillus flavus*, apresentando maior inibição (90%) na dose 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial de alecrim. O extrato de alecrim foi

capaz de induzir a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em colo e raiz de plantas de soja desafiadas com *M. phaseolina* (LORENZETTI et al., 2018).

Dessa forma, verifica-se que o uso de extratos de plantas medicinais, especificamente o alecrim, apresenta-se como uma alternativa para controle de doenças de plantas, podendo ser mais uma ferramenta para o manejo fitossanitário sustentável.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de produtos alternativos apresenta uma importante estratégia para o manejo de doenças em plantas, com possibilidades de reduzir o uso de agrotóxicos na produção de alimentos. Além disso, possuem características desejáveis como: menor toxicidade, amplo modo de ação, degradação rápida pelo meio ambiente e são derivados de recursos renováveis.

A proteção das plantas contra doenças pela indução de resistência, que pode ser conseguida com a aplicação de produtos de origem biótica ou abiótica os quais levam à ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta e, por conseguinte, minimizam os danos causados pelas doenças, principalmente em áreas de cultivo orgânico.

Os extratos de plantas medicinais à exemplo os formulados a base de alecrim vem apresentado resultados promissores no controle de doenças bacterianas e fúngicas, uma vez que, possuem grande riqueza química com princípios ativos, tornando-se fontes potenciais de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRIN, K. S.; RAHIM, M. A.; RUBEL, M. H.; NATARAJAN, S.; SONG, J. Y.; KIM, H. T.; NOU, I. S. Development of race-specific molecular marker for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 3, the causal agent of black rot of crucifers. **Canadian Journal of Plant Science**, Lethbridge, v. 98, n. 5, p. 1119–1125, May./Oct. 2018.

ALMEIDA, E. N. de; MOURA, G. S.; FRANZENER, G. Potenciais alternativas com extratos vegetais no controle da pinta preta do tomateiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, PB, v. 12, n. 4, p. 687-694, abr./set. 2017.

ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. de O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, R. S.; GUIMARÃES, F. C. M.; ABDELNOOR, R. F.; PEREIRA, P. R. G.; PEREIRA, M. C. B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 47, n. 2, p.163- 172, mar./fev. 2012.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de**

Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 4, p. 46-70.

AVATO, P.; ARGENTIRI, M. P. Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. **Phytochemistry Reviews**, Bari, IT, v. 14, n. 6, p. 1019-1033, Apr./May. 2015.

BAENAS, N.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Selecting sprouts of *Brassicaceae* for optimum phytochemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 60, n. 45, p. 11409-11420, Jul./Oct. 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, New Jersey, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sep./Feb. 2008.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 44, n. 3, p. 453-460, set./mar. 2014.

BEDENDO, I. P.; BELASQUE, J. Bactérias fitopatogênicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 143-160.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, cap. 14, p. 215-228.

BLAINSKI, J. M. L.; NETO, A. C. da R.; LUIZ, C.; ROSSI, M. J.; DI PIERO, R. M. *Lactobacillus plantarum* exopolysaccharides induce resistance against tomato bacterial spot. **Journal of Agricultural Science**, Canada, v. 9, n. 2, p. 162-179, Nov./Jan. 2017.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Agrotecnologia da UEG**, Ipameri, GO, v.11, n.1, p. 54-67, nov./fev. 2020.

BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethno-Pharmacology**, Netherlands, v. 229, p. 29- 45, Oct./Jan. 2019.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, n. 1, p. 873-907, Dec./Jul. 1990.

BRAND, S. C.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; SCHEREN, M. B.; ANTONELLO, L. M. Extratos de alho e alecrim na indução de faseolina em feijoeiro e fungitoxicidade sobre *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 40, n. 4, p. 1881-1887. jul./ago. 2010.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Fungitoxic potential of plant extracts on *in vitro* *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v.17, n. 2, p. 230-238, Abr./Jun. 2015.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 85-92.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, Oxford, v.12, n. 5, p. 961-973, Nov./May.1973.

CARVALHO JÚNIOR, R. N.; MOURA, L. S.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, Blacksburg, v. 35, n. 3, p. 197-204, Jun./Jan. 2005.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, cap. 4, p. 81-124.

Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Mapeamento e qualificação da cadeia produtiva das hortaliças no Brasil**. Brasília: CNA, 2017. 79 p.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the actadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, n. 2, p. 407-411, Oct./Jan. 1995.

CONSTABEL, C. P.; RYAN, C. A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 507-511, Nov./Feb. 1998.

COSTA, A. P.; MOURA, G. S.; GEBAUER, J. T.; FRANZENER, G. Extrato aquoso e óleo essencial de gengibre induzem mecanismos bioquímicos de defesa em feijoeiro. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 6, n. 2, p. 79-86, abr./jun. 2019.

DERAL - Departamento de Economia Rural. Divisão de Conjuntura Agropecuária. **Prognóstico olericultura**. Curitiba, PR, p. 1 - 7, nov. 2020. Disponível em: <https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/Olericultura_2021.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2021.

DHAR, S.; SINGH, D. Performance of cauliflower genotypes for yield and resistance against black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). **Indian Journal of Horticulture**, Lucknow, IN, v. 71, n. 2, p. 197-201, Jan./Jun. 2014.

DIOGO, E.; LANÇA, A.; LIMA, A.; AMARAL, A.; RAMOS, A. P. A alternariose da couve-brócolo. **AGROTEC**, Porto, PT, v. 25, p. 55-57, nov./dez. 2017.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, Dec./Jul. 1995.

EMATER – Assistência Técnica e Extensão Rural. **A Agricultura familiar e a olericultura no Paraná**. Curitiba, PR. 2016. Disponível em: <<https://ruralcentro.com.br/noticias/agricultura-familiar-e-a-olericultura-no-parana/81653>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

FERNANDES, F.; PINHO, P. G. de; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. Var. *acephala* germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 15, p. 6595-6802, Mar./Jul. 2009.

FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. p. 153-186.

FIGUEIREDO, G. J. B. de. Hortaliças: negócio do futuro ou do presente? **Casa da Agricultura**, Campinas, SP, n. 2, p. 9-11, abri./mai./jun. 2015.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.

FONTES, P. C. R. A produção de hortaliças - olericultura. In: FONTES, P. C. R.; NICK, C. **Olericultura: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, DAA, 2021. cap. 1, p. 19-29.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v.37, p.165-186, Jan./Jun. 1986.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 839–863, Jan./Apr. 2013.

GERASIMOVA, N. G.; PRIDVOROVA, S. M.; OZERETSKOVSKAYA, O. L. Role of *L*-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n. 1, p.103-105, Apr./Jan. 2005.

GONZÁLEZ-MICHEL, A. **Guía técnica del cultivo de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)**. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2013. 72p.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 40, n. 1, p. 347-369, Jun./Nov.1989.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; ARAÚJO, S. L. F. **Principais doenças em cultivos de pequenas propriedades do entorno de Boa Vista**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2010. 31 p. (Documentos 36/Embrapa Roraima).

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, v. 42, n. 5, p. 462-468, Dec./Feb.2001.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R. E. **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 2002. cap. 11, p. 87-113.

ISHIGE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n. 1, p.193-199, Sep./Jan. 1993.

JETIYANON, K.; PLIANBANGCHANG, P. Lipopolysaccharide of *Enterobacter asburiae* strain RS83: A bacterial determinant for induction of early defensive enzymes in *Lactuca sativa* against soft rot disease. **Biological Control**, Orlando, v. 67, n. 3, p. 301–307, Aug./Dec. 2013.

JONES, D. H. Phenylalanina ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, Nov./Feb.1984.

KOBAYASHI, B. F.; AMARAL, D. R. Efeito de extratos vegetais de plantas do Cerrado para controle de pinta-preta em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 44, n.2, p.189-192, mai./jul. 2018.

KRZYZANIAK, Y.; TROUVELOT, S.; NEGREL, J.; CLUZET, S.; VALLS, J.; RICHARD, T.; BOUGAUD, A.; JACQUENS, L.; KLINGUER, A.; CHILTZ, A.; ADRIAN, M.; HÉLOIR, M. C. A plant extract acts both as a resistance inducer and an oomycide against grapevine downy mildew. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 1-14, Jan./Jul. 2018.

KYUNGSEOK, P.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizobacterial Exopolysaccharides Elicit Induced Resistance on Cucumber. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 18, n. 6, p. 1095-1100, Jul./Jul. 2008.

LAMICHHANE, J. R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J. B.; AUBERTOT, J. N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Berlin, v. 38, n. 28, p. 1-18, Apr./May. 2018.

LEE, L. T.; GARCIA, S. A.; MARTINAZO, A. P.; TEODORO, C. E. de S. Fungitoxidade e composição química do óleo essencial (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. **Research, Society and Development**. Vargem Grande Paulista, SP, v. 9, n. 8, p. e202985628, jun./jun. 2020.

LEMA, M.; CARTEA, M. E.; SOTELO, T.; VELASCO, P.; SOENGAS, P. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 159-169, Dec./May. 2012.

LINTHORST, H. J. M.; VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Wageningen, v. 10, n. 2, p. 123-150, Oct./Dec. 2008.

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

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 395-417, May./Sep. 2010.

LUCAS, G. C.; ALVES, E.; PEREIRA, R. P.; ZACARONI, A. B.; PERINA, F. J. SOUZA, R. M. de. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 94, n. 1, p. 45-51, Jan./Mar. 2012.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G. S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução

em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 34, n. 1, p.34-37, nov./fev. 2008.

MAIA, A. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. R.; FARIA, C. M. D. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; JARDINETTI, V. A.; BATISTA, B. N. Óleos essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, v. 49, n. 5, p. 330-339, fev./abr. 2014.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários - AGROFIT**. 2021. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 28 set. 2021.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das brássicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 165-173.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Fungos fitopatogênicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 107-141.

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

MELO, A. M. T. de; FABRI, E. G. Horticultura no IAC: pesquisa e inovação como instrumento de acesso a novos mercados. **Boletim Técnico-Informativo do Instituto Agronômico**, Campinas, SP, v. 69, p. 2017.

MELO, R. A. C.; VENDRAME, L. P. C.; MADEIRA, N. R.; BLIND, A. D.; VILELA, N. J. Characterization of the Brazilian vegetable brassicas production chain. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 4, p. 366-372, Oct./Dec. 2019.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidases and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 162, n. 4, p. 491-498, Apr./Sep. 2002.

MORAES, W. B. O controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 175-190, jan./abr.1992.

MOURA, G. S.; JASKI, J. M.; FRANZENER, G. Potencial de extratos etanólicos de própolis e extratos aquosos de plantas espontâneas no controle de doenças pós-colheita do morango. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, PB, v. 11, n. 5, p. 57-63, abr./dez. 2016.

MOURA, G. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ALVES, A. P. F.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 79, n. 3, p. 371-379, jul./set. 2012.

NAZ, R.; BANO, A.; WILSON, N. L.; GUEST, D.; ROBERTS, T. H. Pathogenesis-related protein expression in the apoplast of wheat leaves protected against leaf rust following application of plant extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 104, n. 9, p. 933-944. Feb./Sep. 2014.

NOVO, M. C. S. S.; PRELA-PANTANO, A.; TRANI, P. E.; BLAT, S. F. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 321-325, set./ago. 2010.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**. Bari, v. 15, p. 152-158, Dec./Mar. 2016.

PASCHOLATI, S. F. P.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 424-452.

PEIXINHO, G. S.; SANTOS, C. M. G.; RIBEIRO, V. G.; AMORIM, E. P. R.; BISPO, J. S.; CARVALHO, V. N. Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 43, n. 2, p. 155-157, abr./jun. 2017.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, SP, v. 10, n. 2, p. 1-15, fev./fev. 2021.

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v. 33, n. 2, p. 687- 696, nov./abr. 2012.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3426-3436, Nov./Dec. 2004.

RODRIGUES, R. A. S. **Olericultura**. Londrina: Editora e distribuidora Educacional S. A., 2019. 224 p.

RODRIGUEZ, V. M.; SOENGAS, P.; ALONSO-VILLAVARDE, V.; SOTELO, T.; CARTEA, M. E.; VELASCO, P. Effect of temperature stress on the early vegetative development of *Brassica oleracea* L. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, n. 145, p. 1-9, May./Jun. 2015.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, p. 411-431.

RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 175- 179, Jul./Jan. 1997.

RUPPELT, B. M.; KOZERA, C.; ZONETTI, P. C.; PAULERT, R.; STEFANELLO, S. **Plantas medicinais utilizadas na região oeste do Paraná**. Curitiba: UFPR, 2015. 126 p.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M. A. V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, Basingstoke, v. 9, n. 5, p. 344-355, Apr./May. 2011.

SADANA, D; DIDWANIA, N. Bioefficacy of fungicides and plant extracts against *Alternaria solani* causing early blight of tomato. **International Conference on Plant**, Kaula Lumpur, v. 1, n. 2, p. 38-42, Dec./Apr. 2015.

SAHA, P.; KALIA, P.; SHARMA, M.; SINGH, D. New source of black rot disease resistance in *Brassica oleracea* and genetic analysis of resistance. **Euphytica**, Holanda, v. 207, n. 1, p. 35-48, May./Jul. 2016.

SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 10, p. 973- 978, Jan./May. 2000.

SANTOS NETO, J. dos; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SENA, J. O. A. de; JARDINERRI, V. do A.; ALENCAR, M. dos S. R. Qualidade de frutos de tomateiro cultivado em sistema de produção orgânico e tratados com subprodutos de capim limão. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, v. 47, n. 4, p. 633-642, out./dez. 2016.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Nov./Dec. 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; BONALDO, S. M. Uso de extratos vegetais e cogumelos na indução de resistência de plantas a patógenos. In: RODRIGUES, F. A.; FORTUNATO, A. A.; RESENDE, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda., 2012. p. 9-28.

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. **Interação Planta-Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, cap. 6, p. 227-248.

SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SILVA, J. C.; GONÇALVES, R. M.; SOMAN, J. M.; PASSOS, J. R. S.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 156, p. 399-411, Nov./Fev. 2020.

SILVA, C. P. da; GARCIA, K. G. V.; SILVA, R. M. da; OLIVEIRA, L. A. de A.; TOSTA, M. da S. Desenvolvimento inicial de mudas de couve-folha em função do uso de extrato de alga (*Ascophyllum nodosum*). **Revista Verde**, Mossoró, RN, v. 6, n. 1, p. 07-11, jan./mar. 2012.

SILVA, R. S.; OLIVEIRA, M. M. G.; MELO, J. O.; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant

pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amherst, v. 160, p. 40-48, Nov./May. 2019.

SILVA, W. F.; MARQUES, D. J.; SILVA, E. C.; BIANCHINI, H. C.; ISHIMOTO, F. A.; PEREIRA JÚNIOR, M. J. F. Diagnóstico da produção de hortaliça na região metropolitana de Belo Horizonte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 366-370, jul./set. 2015.

SILVA-JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5.ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 239-260.

SIMMONS, E. G. **Alternaria: an identification manual**. Utrecht: ASM, 2007. 775 p.

SOUZA, M. R. da; SANTOS, L. P. dos; BARROS, A. M.; SANTOS, G. R. dos; MORAES, G. K. A.; FERAZ, L. F.; ARAÚJO, V. B. de; FERREIRA, T. P. de. Indução de fitoalexinas por preparações de leveduras, *Trichoderma* e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Palmas, TO, v. 7, n. 3, p. 325-335, set./dez. 2019.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 12, n. 2, p. 89-100, Dec./Jan. 2012.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 16, p. 265-304, 2008.

STANGARLIN, J. R.; SCHULZ, D. G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KUHN, O. J. Induction of phytoalexins in soybean and sorghum by *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 1, p. 91-98, jan./mar. 2010.

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 Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, PR, v. 10, n. 1, p. 18-46, set./dez. 2011a.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. ed. Badajoz: Formatex, 2011b. v. 1, p. 1033-1042.

STASI, L. C. D. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: STASI, L. C. D. **Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. cap. 3, p. 109-127.

STEVANOVIĆ, Z. D.; BOŠNJAK-NEUMÜLLER, J.; PAJIĆ-LIJAKOVIĆ, I.; RAJ, J.; VASILJEVIĆ, M. Essential oils as feed additives-future perspectives. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 7, p. 1-20, Jun./Jul. 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense down regulation of polyphenol oxidases results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 1, p. 105- 117, Aug./Nov. 2004.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 1, p. 21-34, jan./jun. 2015.

TOLEDO, M. V.; STANGARLIN, J. R.; BONATO, C. M. Homeopathy for the control of plant pathogens. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. ed. Badajoz: Formatex, 2011. v. 1, p. 1063-1067.

TOLEDO, M. V.; STANGARLIN, J. R.; BONATO, C. M. Controle de pinta preta e efeito sobre variáveis de crescimento em tomateiro por preparados homeopáticos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 41, n. 2, p. 126-132, out./mar. 2015.

TRANI, P. E.; TIVELLI, S. W.; BLAT, S. F.; PANTANO, A. P.; TEIXEIRA, E. P.; ARAÚJO, H. S. de.; FELTRAN, J. C.; PASSOS, F. A.; FIGUEIREDO, G. J. B. de.; NOVO, M. C. S. S. **Couve de folha: do plantio à pós-colheita**. 1. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2015. 36 p.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 135-162, Mar./Sep. 2006.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R.; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 659-665, Nov./Jul. 1988.

VELASCO, P.; LEMA, M.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; CARTEA, M. E. *In vivo* and *in vitro* effects of secondary metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecules**, Basel, CH, v. 18, n. 9, p. 11131-11143, Aug./Sep. 2013.

VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 37, n. 1, abr./jan. 2011.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, Surrey, v. 3, n. 5, p. 232-238, Jan./May. 1998.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 14, n. 1, p. 2-18, Oct./Jan. 2013.

VIDIGAL, S. M.; PEREIRA, P. R. G. Cultivo de brássicas. In: FONTES, P. R. R.; NICK, C. **Olericultura: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, DAA, 2021. p. 467-485.

WANG, K. D.; BORREGO, E. J.; KENERLEY, C. M.; KOLOMIETS, M. V. Oxylipins other than jasmonic acid are xylem-resident signals regulating systemic resistance induced by *Trichoderma virens* in maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 32, n. 1, p. 166-185, Nov./Jan. 2020.

WANG, X. D.; BI, W. S.; GAO, J.; YU, X. M.; WANG, H. Y.; LIU, D. Q. Systemic acquired resistance, NPR1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. **Journal of Integrative Agriculture**, Pequim, v. 17, n. 11, p. 2468-2477, Sep./Jan. 2018.

WILLIAMS, P. H. Black rot. In: RIMMER, S. R.; SHATTUCK, V. I.; BUCHWALDT, L. **Compedium of brassica diseases**. Saint Paul: APS Press, 2007. p. 60-62.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemistry Journal**, London, v. 322, n. 3, p. 681-692, Sep./Mar. 1997.

WULFF, N. A. Bactérias causadoras de doenças em vegetais. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. v. 13, p. 51-114.

XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 12, p. 4286-4289, Mar./Jun. 2005.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, Porto, v. 27, n. 5, p. 361-422, Nov./Jan. 2003.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 11, p. 1499- 1503, out./nov. 2009.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FORMULADOS A BASE DE ALECRIM CONTRA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* E *Alternaria brassicae*

1 RESUMO

Considerando a demanda por produtos fitossanitários alternativos aos tradicionais pesticidas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de formulados orgânico e químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e *Alternaria brassicae* isolados de couve folha. A atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada a partir de colônia jovens (com 32 h) de Xcc preparada em suspensão 1×10^8 UFC mL⁻¹ com solução salina (0,85% de NaCl) estéril em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura caldo nutriente, acrescido dos tratamentos 0 (meio de cultura); 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6% (massa/volume), avaliando-se a absorbância a 580 nm. A atividade antifúngica *in vitro* foi feita em meio de cultura suco V8-ágar, esterilizado em autoclave e vertido em placas de Petri, avaliando-se diâmetro das colônias e esporulação, bem como a germinação de esporos em lâminas de microscopia recobertas com ágar-água 1%. Os formulados químico e orgânico reduziram o crescimento de Xcc em 74,5% e 54,8%, respectivamente. Os formulados inibiram o crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. brassicae* em todas as concentrações testadas de maneira dose-dependente. Houve inibição do crescimento micelial em 40% e 33%, esporulação em 61,35% e 54,5% e na germinação de conídios em 77,41% e 68,22% no formulado químico e orgânico, respectivamente, na concentração 6%. Esses resultados indicam o potencial antimicrobiano dos formulados sobre *X. campestris* pv. *campestris* e *A. brassicae*.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Rosmarinus officinalis*. Planta medicinal. Controle alternativo.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY BASED FORMULATES ON *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* AND *Alternaria brassicae*

2 ABSTRACT

Considering the demand for alternative phytosanitary products to traditional pesticides, this work aimed to evaluate the antimicrobial activity of organic and chemical rosemary-based formulations (*Rosmarinus officinalis*) on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) and

Alternaria brassicae isolated from cabbage leaf. The *in vitro* antibacterial activity was performed from young colony (with 32 h) of *Xcc* prepared in 1×10^8 CFU mL⁻¹ suspension with sterile saline solution (0.85% NaCl) in test tubes containing 5 mL of nutrient broth culture medium, plus the treatments 0 (culture medium); 0.5%; 1%; 2%; 4% and 6% (weight/volume), evaluating the absorbance at 580 nm. The *in vitro* antifungal activity was performed in V8-agar juice culture medium, sterilized in autoclave and poured into Petri plates, evaluating colony diameter and sporulation, as well as spore germination on microscope slides covered with 1% water-agar. The chemical and organic formulations reduced the growth of *Xcc* by 74.5% and 54.8%, respectively. The formulations inhibited mycelial growth, sporulation, and spore germination of *A. brassicae* at all concentrations tested in a dose-dependent manner. Also, there was an inhibition of mycelial growth in 40% and 33%, sporulation in 61.35% and 54.5% and in the germination of conidia in 77.41% and 68.22% in the chemical and organic formulations, respectively, in the concentration of 6%. These results indicate the antimicrobial potential of the formulates on *X. campestris* pv. *campestris* and *A. brassicae*.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Rosmarinus officinalis*. Medicinal plant. Alternative control.

3 INTRODUÇÃO

A podridão negra e a mancha de alternaria são doenças causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae*, respectivamente, que reduzem a produtividade da couve folha (*Brassica oleracea*) e elevam o custo de produção devido ao aporte de insumos químicos utilizados durante todo o ciclo da cultura com intuito de prevenir e ou controlar estes patógenos (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016).

O uso de agrotóxicos nos cultivos de hortaliças pode causar diversos problemas, tanto ao homem como a contaminação dos alimentos e a intoxicação de produtores, quanto ao meio ambiente, como a contaminação do solo, da água, a resistência de patógenos a diversos princípios ativos, o desequilíbrio biológico, a eliminação de organismos benéficos e a perda da biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2018). Neste contexto, o uso de fungicidas ecológicos ou produzidos a partir de extratos vegetais torna-se uma opção.

A redução da aplicação de produtos químicos nos cultivos de hortaliças somente será possível se houver conhecimento a respeito do patossistema desses microrganismos de importância econômica, bem como a sensibilidade desses patógenos em relação ao espectro de ação antimicrobiana proveniente dos extratos vegetais. Dessa forma, através de técnicas de

detecção de *in vitro* que demonstram a sensibilidade e ou resistência dos patógenos, é possível selecionar extratos vegetais que possam ser usados em métodos de controles alternativos. Nos últimos anos têm-se aumentado o número de pesquisas nesse âmbito, devido à eficiência e confiabilidade nos testes *in vitro* em laboratórios visando a seleção de novos produtos para controle de doenças (BARROS; GOMES; CALVACANTI, 2015).

O alecrim, *Rosmarinus officinalis* L. (família Lamiaceae) representa uma importante fonte de compostos bioativos como cineol, cânfora, pipeno, canfeno, terpineol, ácido rosmarínico e os compostos polifenólicos, incluindo os flavonoides, capazes de controlar doenças, tanto pela ação antimicrobiana direta no patógeno, quanto pela ação indireta, através da ativação de mecanismos de defesa das plantas (ZAOUALI; BOUZAINÉ; BOUSSAID, 2010; LORENZETTI; STANGARLIN; KUHN, 2017).

A atividade antimicrobiana do alecrim em experimento *in vitro* contra *Alternaria* sp. foi observada com sucesso por Díaz Dellavalle et al. (2011), pela redução da esporulação do patógeno. Camatti-Sartori et al. (2011), utilizando extrato acético de alecrim na concentração de 25%, verificaram a inibição de 48% do crescimento micelial de *Fusarium* sp. e 90% do fungo *Botrytis* sp. Lorenzetti, Stangarlin e Kuhn (2017) verificaram que o extrato aquoso de alecrim na concentração de 5% reduziu o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* em meios sólidos e líquidos em 44% e 74%, respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de formulados a base de alecrim contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae* isolados de couve folha.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon-PR (24° 33' 40" de latitude Sul e 54° 04' 12" de longitude Oeste), no período de junho 2019 a outubro 2020.

Os patógenos foram isolados a partir de lesões em folhas de couve folha as quais apresentavam sintomas característicos da podridão negra causada por *X. campestris* pv. *campestris* e da mancha de alternaria causada por *A. brassicae*, provenientes de cultivo comercial no município de Marechal Cândido Rondon-PR.

Para isolamento de *X. campestris* pv. *campestris*, fragmentos de folha (5 mm x 5 mm) foram retirados na área de transição do tecido sadio e da lesão, em seguida imersos em

solução aquosa de etanol 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 1 min e enxaguados em água destilada conforme metodologia descrita por Mafia, Alfenas e Gonçalves (2016). Após a desinfestação superficial, foram triturados em tubos contendo solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada, e em seguida, com alça de platina transferiu-se uma alíquota do homogeneizado para placas de Petri contendo meio ágar-nutriente. As placas foram mantidas em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) por 48 h a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h. A preservação da bactéria ocorreu em solução salina 0,85% a 10 °C (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016).

O isolado de *A. brassicae* foi obtido conforme metodologia descrita por Alfenas et al. (2016), em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Um disco de micélio com aproximadamente 5 mm de diâmetro retirado do meio BDA foi transferido para placa de Petri contendo o meio suco V8-ágar, (200 mL de suco V8, 20 g de ágar, 3 g de CaCO₃ e 1000 mL ADE) esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 min e 1 atm, e incubadas em B.O.D. a 25 °C durante sete dias. Posteriormente, o isolado foi transferido e preservado pelo método de Castellani (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016).

4.2 FORMULADOS A BASE DE ALECRIM

Foram utilizados dois formulados a base de alecrim: All Crim ConvencionalTM composto por fontes minerais de nitrogênio (1%), cobre (5%) e cálcio (29%) e All Crim OrgânicoTM composto por fontes orgânicas de nitrogênio (1,87%), cálcio (0,37%), potássio (1,13%) e fósforo (0,36%), ambos contendo pó solúvel de alecrim. Os dois formulados foram utilizados nas concentrações 0%; 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6%, diluídos em água destilada esterilizada (massa/volume).

4.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro*

Foram utilizados tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura caldo nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de glicose e 1000 mL de água destilada esterilizada) (MARIANO; SOUZA; GAMA, 2016), acrescido das concentrações dos formulados. Constituíram-se como testemunha somente o meio de cultura + a bactéria e adicionou-se mais um tubo sem bactéria e apenas com meio de cultura para leitura de absorbância (branco).

A partir de colônia jovens (com 32 h) de *X. campestris* pv. *campestris*, foi preparada uma suspensão 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹ com solução salina (0,85% de NaCl) estéril. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 30 µL da suspensão de células bacterianas em cada tubo de ensaio, os quais foram incubados a 25 ± 1 °C por 48 h em estufa

sob agitação a 150 rpm. A avaliação da multiplicação bacteriana foi determinada pela leitura de absorbância a 580 nm em espectrofotômetro.

4.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro*

Os formulados nas devidas concentrações foram incorporados em meio de cultura suco V8-ágar e esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm por 20 min e, em seguida, vertidos em placas de Petri. Um disco de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *A. brassicae* foi retirado da borda da colônia cultivada em meio BDA (colônia com 7 dias), e repicado para o centro de cada placa de Petri, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas a 25 ± 1 °C e no escuro (BALBI-PEÑA et al., 2006).

As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), com uma régua graduada em milímetros, iniciando 24 h após a instalação do experimento. As colônias foram avaliadas durante um período de 6 dias ou até que, em uma das placas, o micélio já tivesse tomado por completo a superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999). Com os valores obtidos foi calculada a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) pela equação:

$$AACCM = \left[\left[\frac{(Y_1 + Y_{1+1})}{2} * I \right] + \left[\left[\frac{(Y_2 + Y_{2+1})}{2} * I \right] \dots \left[\left[\frac{(Y_n + Y_{n+1})}{2} * I \right] \right] \right]$$

Onde:

AACCM = área abaixo da curva de crescimento micelial (adimensional);

Y_i e Y_{i+1} = Tamanho do micélio do fungo observado em duas avaliações consecutivas (cm);

I = intervalo entre duas avaliações consecutivas (dias).

O teste de inibição de esporulação foi realizado ao término do teste de inibição do crescimento micelial, avaliando a produção de esporos em cada uma das placas usadas no teste. Dessa forma, foram adicionados 10 mL de água destilada em cada placa de Petri, seguido de raspagem da colônia com espátula inoxidável esterilizada e filtragem da suspensão de esporos em gaze. A contagem do número de esporos mL^{-1} foi realizada em câmara de Neubauer e em microscópio óptico (BALBI-PEÑA et al., 2006).

A germinação de conídios foi avaliada em lâmina de microscopia revestida com 800 μL de ágar-água 1% autoclavado. Para tanto, uma alíquota 50 μL das concentrações dos formulados a base de alecrim (corrigidas para se manter as concentrações citadas anteriormente)

e alíquota de 50 µL da suspensão de esporos (2×10^4 conídios mL⁻¹) de *A. brassicae*, obtidas de uma colônia com 7 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas.

Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida no escuro a 25 ± 1 °C por 24 h (BALBI-PEÑA et al., 2006). Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada. Após 24 h cada lâmina recebeu 40 µL de azul algodão com lactofenol para paralisar a germinação dos esporos. A avaliação foi realizada pela contagem de esporos germinados em microscópio óptico. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Ambos experimentos possuíam seis tratamentos representados pelos formulados químico e orgânico a base de alecrim com seis concentrações e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) a ($p \leq 0,05$) realizada no Software livre Genes (CRUZ, 2013) e quando significativos foram submetidos à análise de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Observou-se inibição da multiplicação de *X. campestris* pv. *campestris* de maneira dose-dependente. Os formulados de alecrim químico e orgânico apresentaram efeito direto sobre a multiplicação *in vitro* da bactéria, tendo seus comportamentos representados por equação quadrática. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,33% do formulado químico e no orgânico na concentração 5,79%, na qual o menor valor de absorvância foi 0,28 e 0,51 respectivamente (Figura 1).

Os formulados foram capazes de reduzir o crescimento *in vitro* das colônias de *X. campestris* em todas as concentrações testadas. Entretanto, as maiores concentrações (4% e 6%) foram capazes de diminuir significativamente a multiplicação da bactéria, levando a uma redução média de 61,8 % e 74,5% para o formulado químico, enquanto as médias 45,8% e 54,8% foram obtidas no formulado orgânico quando comparadas com à testemunha.

Comportamento semelhante ao presente trabalho foram obtidos por Vigo et al. (2009), quando observaram ação inibitória *in vitro* em isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao utilizarem óleo essencial de alecrim a partir da concentração de 1%, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a eficiência do óleo sobre a inibição do patógeno.

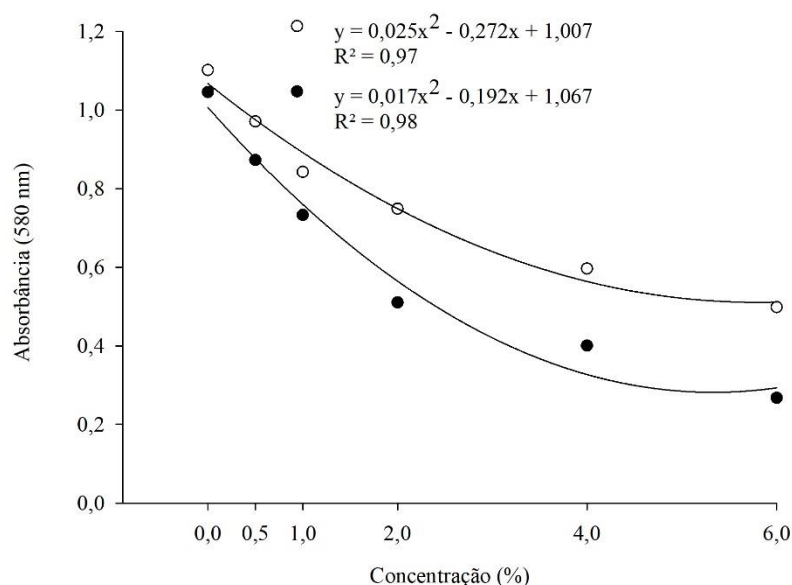


Figura 1 - Efeito de concentrações dos formulados a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) químico (●) e orgânico (○) sobre o crescimento de *X. campestris* pv. *campestris*. (●) CV = 6,33% e (○) CV = 6,15%.

Martins et al. (2011), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim nas concentrações de 4% e 8%, verificaram ação inibitória em *Ralstonia solanacearum* em frutos de tomate e tubérculos de batata. Lima (2016) confirmou em ensaio *in vitro*, que o óleo essencial de alecrim a partir da concentração de 0,5% inibiu completamente o crescimento de *R. solanacearum*.

Essas atividades antibacterianas poderia ser explicadas pelo fato do alecrim possuir princípios ativos como α -pipeno, 1,8-cineol, canfeno, cânfora e borneol, como também compostos monoterpênicos responsáveis por romper as paredes celulares e membrana citoplasmática, perturbando a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos, comprovando que a citotoxicidade parece incluir tais danos às membranas dos patógenos e rompimento de parede celular (CUTRIM et al., 2019).

O ácido rosmarínico, rosmaridifenol, carnosol, apirosmanol, ácido carnósico, rosmanol e isorosmanol, presentes no alecrim, interagem com a membrana celular, causando alterações no material genético e nos nutrientes, alterando o transporte de elétrons, vazamento de componentes celular e alterações na produção de ácido graxos, além disso, interage com a membrana, causando perda da funcionalidade da membrana e sua estrutura (NIETO; ROS; CASTILLO, 2018).

Vale ressaltar outro ponto importante em relação aos formulados a base de alecrim utilizados no presente trabalho, principalmente o químico, que exerceu uma efetiva atividade

antibacteriana em relação ao orgânico, pode estar relacionado à presença do micronutriente cobre em sua composição, que é um importante nutriente com atividade antimicrobiana. Quando o cobre entra em contato com a bactéria, este causa distorção repentina da parede celular e destruição da membrana celular, pois os íons de cobre que tem uma forte redução podem extrair os elétrons das bactérias, fazendo com que o seu citoplasma escorra e o seu núcleo celular oxide, causando sua morte (SHEIKH et al., 2011).

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a atividade antifúngica houve inibição do crescimento micelial de maneira dose-dependente, com redução da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM), tendo seu comportamento representado por equação quadrática. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,31% do formulado químico e 5,22% do orgânico, onde se verificam as menores AACCM, com valores de 16,02 e 18,76, respectivamente (Figura 2). Os formulados químico e orgânico a base de alecrim, na concentração 6%, inibiram o crescimento em 40% e 33%, respectivamente em relação a testemunha.

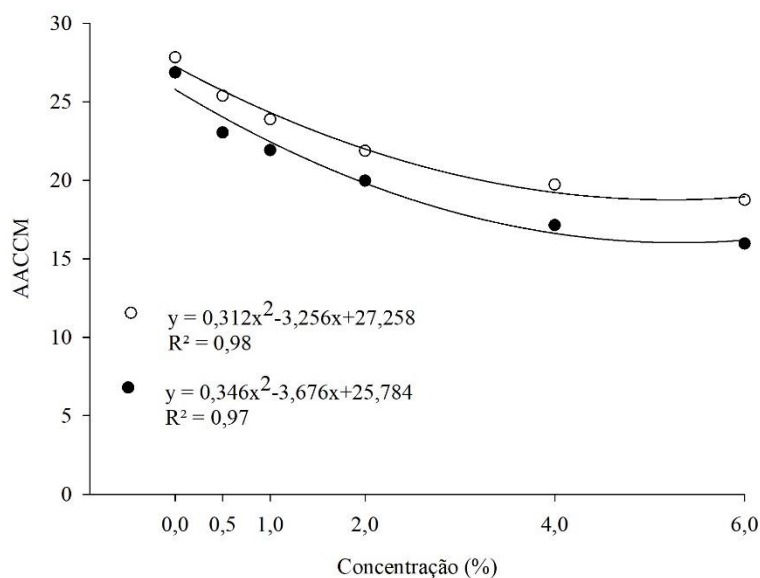


Figura 2 - Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) de *Alternaria brassicae* em meio de cultura suco V8-ágar acrescido de formulados químico (●) e orgânico (○) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (●) CV = 2,80% e (○) CV = 2,37%.

Yilmaz, Ermis e Boyraz (2016), observaram que o óleo essencial de alecrim na concentração 500 µl/L resultou na inibição em média de 30% a 85% do crescimento micelial

de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Nascimento et al. (2020), verificaram que o óleo essencial de alecrim na concentração 0,75% inibiu completamente o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo considerado eficaz no controle *in vitro* deste patógeno. Rabari, Chudashama e Thaker (2017), utilizando óleo essencial de alecrim na concentração 5 μ L, verificaram uma zona de inibição entre 5 mm 20 mm do crescimento micelial do *Colletotrichum gloeosporioides*.

Lorenzetti, Stangarlin e Kuhn (2017), avaliando o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* em meio BDA contendo concentrações do extrato de alecrim, verificaram que a concentração 4,5% apresentou a menor AACCM. Hillen et al. (2012), estudando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim, observaram que a partir da concentração 20% houve 100% de inibição do crescimento micelial de *Alternaria carthami*, *Alternaria sp.* e *Rhizoctonia solani*.

Ao analisar a influência das concentrações dos formulados químico e orgânico a base de alecrim na esporulação de *A. brassicae*, observou-se modelo de regressão quadrática com efeito dose-dependente. Os tratamentos com formulado químico e orgânico inibiram a esporulação em 61,35% e 54,5%, respectivamente, com a aplicação da concentração 6%, quando comparado a testemunha (Figura 3).

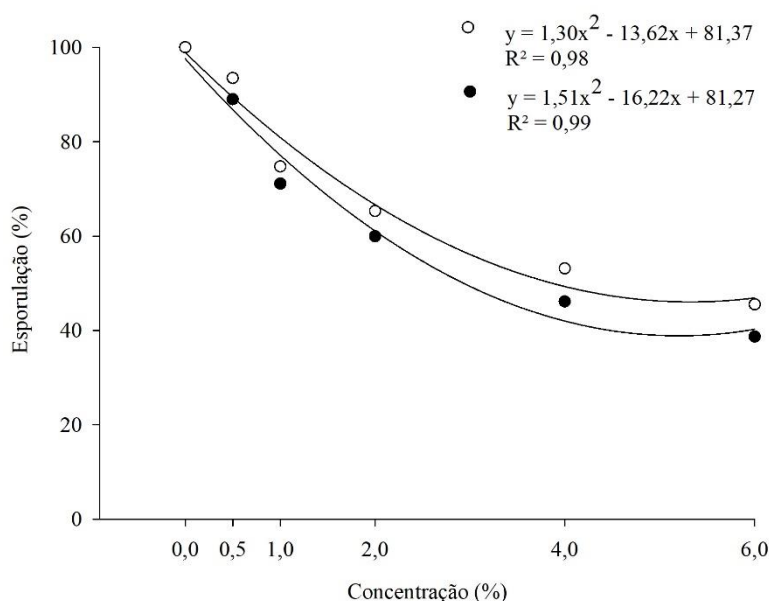


Figura 3 - Porcentagem de esporulação de *Alternaria brassicae* em função dos tratamentos com formulados químico (●) e orgânico (○) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (●) CV = 7,34% e (○) CV = 8,91%.

Os resultados obtidos corroboram com os de Mamprim et al. (2013), quando utilizaram o extrato de alecrim na concentração de 10% e observaram redução da formação de conídios

de *M. anisopliae* entre 24% a 39%. Nascimento et al. (2020), observaram inibição de 100% na esporulação quando utilizou o óleo essencial de alecrim (contendo 23,5% de β -mircenol, 22% de 1,8 cineol e 20% de α -pineno) na concentração 0,75% sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Da mesma forma, Silva et al. (2018), utilizando o óleo essencial de alecrim, verificaram redução na esporulação *in vitro* de *Bipolaris oryzae*.

Em estudos realizados por Itako et al. (2008), verificou-se o poder inibitório dos extratos brutos aquosos de *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *R. officinalis* nas concentrações de 20% e 40%, com redução acima de 90% da esporulação de *Alternaria solani*.

Os formulados químico e orgânico a base de alecrim inibiram a germinação dos esporos de *A. brassicae*, tendo seu comportamento representado por modelo de regressão quadrática em função das concentrações crescentes. A partir da regressão pode-se verificar que o ponto de mínima ocorreu na concentração 5,40% do formulado químico e 5,42% do orgânico, onde se verificou a menor porcentagem de germinação de conídios, de 20,99% e 30,68%, respectivamente (Figura 4). Houve redução de 77,41% na germinação de esporos no formulado químico e 68,22% do orgânico quando se utilizou a concentração de 6%.

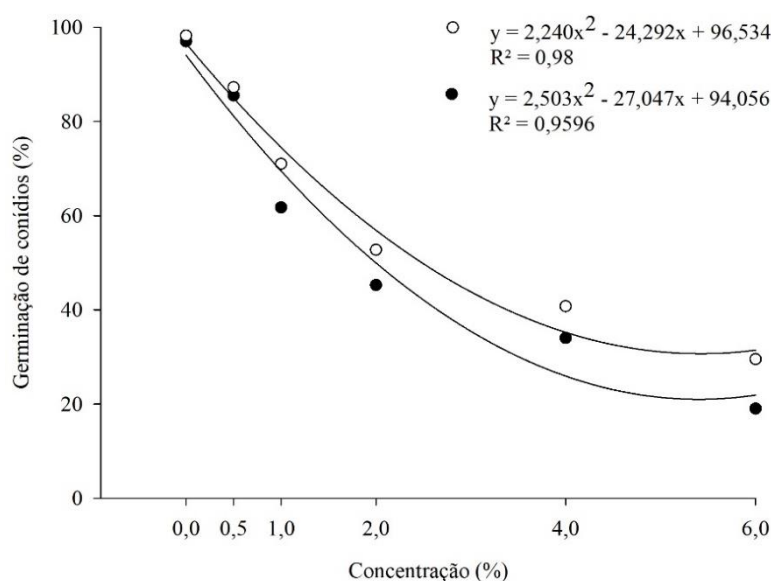


Figura 4 - Inibição *in vitro* da germinação de esporos de *A. brassicae* em função dos tratamentos com formulados químico (●) e orgânico (○) a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (●) CV = 11,39% e (○) CV = 8,30%.

Resultados semelhantes a presente pesquisa foram encontrados por Andrade e Vieira (2016), quando verificaram que 50 e 100 μ L de óleo essencial de alecrim reduziram em 70% e 78% o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e na germinação de esporos observaram reduções em torno 31,2% utilizando 30 μ L. Testando extrato aquoso de alecrim

nas concentrações de 5%, 10% e 20%, Marcondes et al. (2014) observaram que a germinação de conídios de *Fusarium moniliforme* foi menor em todas as concentrações testadas. Itako et al. (2009), ao avaliarem o efeito do extrato bruto aquoso de alecrim sobre a germinação dos esporos de *Cladosporium fulvum*, observaram redução de 65,14% da germinação na concentração de 40%.

Esses resultados sustentam a hipótese de que o alecrim possui ação antimicrobiana, podendo estar relacionado aos compostos antifúngicos presentes em suas folhas como por exemplo cineol, pineno, borneol e cânfora. Esses compostos podem afetar os microrganismos de várias formas, como pela desorganização da membrana citoplasmática de suas células, quanto pela quebra do fluxo de elétrons e transporte ativo desbalanceado, porém, não se pode dizer como cada um atua separadamente, pois vários desses compostos trabalham de forma conjunta (BAKKALI et al., 2008; COSTA et al., 2011).

Além do alecrim presente nos formulados, tem-se os nutrientes que podem ter ação direta sobre os fitopatógenos como o nitrogênio e o cobre constituintes do formulado químico, e o potássio e o fósforo presentes no formulado orgânico. Santos et al. (2018), utilizando fosfito de cobre e potássio na concentração de 0,006%, verificaram ação fungicida, não havendo o crescimento *in vitro* de *Pythium* sp. Pereira (2018), em pesquisa com nitrato de cobre na dose 146,5 mg Kg⁻¹ de Cu²⁺ observou inibição de 99,7% da germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* em condições *in vitro*.

Sobrinho et al. (2016), testando fosfito de potássio no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro, e verificaram inibição do patógeno na concentração de 50 mg L⁻¹ em cultivo *in vitro*, bem como Schurt et al. (2013), testando a eficiência do fosfito de potássio *in vitro* sobre *R. solani*, verificaram inibição do crescimento micelial do patógeno.

Rezende et al. (2020), em estudo para verificar o efeito do fosfito de potássio no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*, verificaram que o produto inibiu em 50% o crescimento micelial do fungo, além disso, o produto reduziu a espessura das hifas, aumentou o número de ramificações atrofiadas e comprometeu a síntese da parede celular do fitopatógeno. Ortíz e Zapata (2012) também verificaram que o fosfito de potássio teve ação inibitória sobre a germinação dos esporos de *Mycosphaerella fijiensis*.

Os resultados indicam o potencial antifúngico dos formulados a base de alecrim de forma direta sobre *A. brassicae* e *X. campestris* pv. *campestris*. Considera-se ainda a necessidade de continuidade das pesquisas para controle desses patógenos quando em interação com a planta hospedeira couve folha, avaliando-se a redução na intensidade das doenças, seja de maneira antimicrobiana direta ou por indução de resistência.

6 CONCLUSÃO

Os formulados químico e orgânico a base de *R. officinalis* apresentaram atividade antimicrobiana direta sobre *X. campestris* pv. *campestris* e *A. brassicae* isolados de couve folha, de maneira dose-dependente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 2, p. 55-92.

ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose *in vitro* e em frutos de mamoeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 18, n. 1, p. 367-372, mai./fev. 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, New Jersey, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sep./Feb. 2008.

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 – I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 3, p. 310-314, mai./jun. 2006.

BARROS, J. de S. G.; GOMES, E. C. de S.; CALVACANTI, L. S. Efeitos de extratos de *Allamanda blanchetti* no controle de *Alternaria brassicicola* em mudas de couve-manteiga. **Revista Caatinga**, Mossoró, RN, v. 8, n. 3, p. 36-46, jul./set. 2015.

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F. E.; CRIPPA, L. B.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; MARCHETT, C. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, RS, v. 6, n. 2, p.117-122, abr./ago. 2011.

COSTA, A. T.; AMARAL, M. F. Z.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M.; BARA, M. T. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 13, n. 2, p. 240-245, mai./abr. 2011.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v. 35, n. 3, p. 271-276, Jul./Sep. 2013.

CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). **Revista Virtual Química**, Niterói, RJ, v. 11, n. 1, p. 60-81, mar./jan. 2019.

DÍAZ DELLAVALLE, P.; CABRERA, A.; ALEM, D.; LARRAÑAGA, P.; FERREIRA, F.; RIZZA, M. D. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus

Alternaria spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Canelones, v. 71, n. 2, p. 231-239, Apr./Jun. 2011.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 3, p. 92-105.

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

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**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 241-244, mai./jun. 2008.

ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 76, n. 1, p. 75-83, jan./mar. 2009.

LIMA, M. A. G. **Óleos essenciais e silício no controle de murcha bacteriana no tomateiro**. 2016. 89 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2016.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. Antifungal activity of rosemary extract on *Macrophomina phaseolina* and charcoal rot control in soybean. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 99, n. 3, p. 777-780, Feb./Jun. 2017.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 6, p. 145-170.

MAMPRIM, A. P.; ALVEZ, L. F. A.; PINTO, F. G. da S.; FORMENTINI, M. A.; MARTINS, C. C.; BONINI, A. K. Efeito de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v. 34, n. 4, p. 1451-1466, jul./ago. 2013.

MARCONDES, M. M.; MARTINS MARCONDES, M.; BALDIN, I.; MAIA, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R. Influência de diferentes extratos aquosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, SP, v. 16, n. 4, p. 896-904, set./mai. 2014.

MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B.; GAMA, M. A. S. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. de. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 3. ed. Recife: UFRPE, 2016, cap. 5, p. 51-55.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das brássicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p.165-173.

- MARTINS, E. S. C. da S.; FARIAS, A. de A; SANTOS, M. da S.; BARROS, H. M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais no controle *in vitro* da *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, PB, v. 5, n. 1, p. 25-29, dez./mar. 2011.
- NASCIMENTO, D. M.; SANTOS, P. L.; RIBEIRO-JÚNIOR, M. R.; SARTORI, M. M. P.; KRONKA, A. Z. Essential oils control anthracnose in pepper seeds. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, SP, v. 9, n. 10, p. 1-19, Apr./Oct. 2020.
- NIETO, G.; ROS, G. CASTILLO, J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): a review. **Medicines**, Basel v. 5, n. 3, Jun./Sep. 2018.
- OLIVEIRA, J. L. S.; LIMA, A. C. B.; MININI, D.; SILVA, E. Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. **Agrarian Academy**, Goiânia, GO, v. 5, n. 9, p. 454-467, jul./jul. 2018.
- ORTÍZ, A. M. M.; ZAPATA, J. C. Evaluación *in vitro* de inductores de resistência sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. **Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín**, Medellín, v. 65, n. 1, p. 6327-6336, Jan./Jun. 2012.
- RABARI, V. P.; CHUDASHAMA, K. S.; THAKER, V. S. In vitro screening of 75 essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides*: A causal agent of anthracnose disease of mango. **International Journal of Fruit Science**, New York, v. 18, n. 1, p. 1-13, Feb./Oct. 2017.
- PEREIRA, A. B. **Fontes de cobre no controle da ferrugem do cafeeiro**. 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2018.
- REZENDE, C. R.; BRANDÃO, D. F. R.; BRAND, S. C.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S. F.; MAFRA, N. M. Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, SP, v. 9, n. 10, e5369108822, set./out. 2020.
- SANTOS, S. L. dos; CAMPOS, T. de; DALLACOSTA, N. L.; MAZARO, S. M. Potencial de produtos à base de fosfitos no controle de *Pythium* sp. em condições *in vitro*. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, PR, v. 11, n. 1, p. 105-110, jan./abr. 2018.
- SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. A.; SOUZA, N. F. A.; REIS, R. D. Eficiência de diferentes moléculas na redução dos sintomas da queima das bainhas em arroz e no crescimento de *Rhizoctonia solani in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 2, p. 221-225, mar./bar. 2013.
- SHEIKH, F. A.; KANJWAL, M. A.; SARAN, S.; CHUNG, W. J.; KIM, H. Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials. **Applied Surface Science**, Holanda, v. 257, n. 7, p. 3020-3026, Jul./Jan. 2011.
- SILVA, W. R.; MOREIRA-NUÑEZ, V.; GAVIRIA-HERNANDÉZ, V.; GOLÇALVES, V. P. AZAMBUJA, R. H. M.; FARIAS, C. R. J. de. Fungitoxicidade de extratos vegetais e óleo essencial de alecrim no crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris oryzae*. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 29, n. ¾, p. 257-265, abr./ago. 2018.
- SOBRINHO, G. G. R.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, A.; JESUS JUNIOR, W. C.; NOVAES, Q. S. Efeito de fosfito de potássio no crescimento e na densidade micelial do

Fusarium solani do maracujazeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 42, n. 2, p. 180-182, nov./jan. 2016.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 11, n. 3, p. 16-21, jul./nov. 1999.

VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. de C.; LIMA, G. P. P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 35, p. 293-304, ago./jun. 2009.

YILMAZ, A.; ERMIS, E.; BOYRAZ, N. Investigation of in vitro and in vivo anti-fungal activities of different plant essential oils against postharvest apple rot diseases *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Journal of Food Safety and Food Quality**, Giessen, v. 67, n. 5, p. 113-148, Jun./Oct. 2016.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, New Jersey, v. 48, n. 11, p. 3144-3152, Apr./Aug. 2010.

CAPÍTULO II

FORMULADOS A BASE DE ALECRIM PARA CONTROLE DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM COUVE FOLHA

1 RESUMO

A couve folha pode ter a sua produtividade limitada por várias doenças, o que demanda o uso de agrotóxicos. No entanto, na busca de uma agricultura ambientalmente sustentável, novas medidas de proteção das plantas aos patógenos têm sido desenvolvidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o controle e a indução de mecanismos de resistência em couve folha contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a partir de fertilizante foliar a base de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Para tanto, formulações contendo fontes orgânica e química de fertilizantes acrescidos de pó solúvel de *R. officinalis*, nas concentrações 0%, 0,5%, 1%, 2%, 4% e 6%, foram pulverizados na 3ª folha três dias antes da inoculação do patógeno que ocorreu nas 3ª e 4ª folhas. Foram avaliados a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massas frescas e seca de parte aérea e raiz, volume de raiz, área foliar, teor de clorofila e as enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (FAL). O uso dos formulados químico e orgânico a base de alecrim na concentração 6% reduziram a AACPD em 37% e 35%, respectivamente. Houve incremento na atividade de peroxidase, tanto local quanto sistêmico, já no 1º dia após o tratamento na concentração 6% do formulado químico, sendo que atividade local da enzima se estendeu até o 2º dia após o tratamento com incremento acima de 60% em relação a testemunha. A concentração 6% do formulado orgânico promoveu aumento na atividade local de peroxidase no 2º dia após o tratamento, com incremento acima de 62% em relação a testemunha, no entanto, somente no 3º dia após o tratamento ocorreu indução sistêmica. Para a atividade de FAL todas as concentrações testadas do formulado químico incrementaram a atividade enzimática tanto local quanto sistemicamente no 1º dia após o tratamento, porém, as concentrações 6% e 4% mantiveram pico local no 2º e 3º dia, respectivamente, com incremento acima de 50% maior que a testemunha. O formulado orgânico promoveu atividade local de FAL no 1º dia após o tratamento na concentração 4% e 6% com incremento acima de 64% em relação a testemunha. Todas as concentrações do formulado orgânico promoveram incremento na atividade de FAL deste o 1º até o 2º dia após o tratamento. A enzima polifenoloxidase não foi alterada com a aplicação dos formulados. Dessa forma, fertilizante foliar contendo *R. officinalis* controla a podridão negra em couve folha, possivelmente por indução de resistência.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*. Podridão negra. Indução de resistência.

ROSEMARY-BASED FORMULATIONS CONTROL *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IN LEAFY CABBAGE

2 ABSTRACT

Cabbage leaf can have its productivity limited by several diseases, which demands the use of agrochemicals. However, in the search for an environmentally sustainable agriculture, new plant protection measures against pathogens have been developed. The objective of this work was to evaluate the control and induction of resistance mechanisms in cabbage against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using *Rosmarinus officinalis*-based foliar fertilizer. Formulations containing organic and chemical fertilizer sources plus soluble powder of *R. officinalis*, at concentrations 0%, 0.5%, 1%, 2%, 4% and 6%, were sprayed on the 3rd leaf three days before inoculation of the pathogen that occurred on the 3rd and 4th leaves. The area under the disease progress curve (AACPD), fresh and dry masses of aerial part and root, root volume, leaf area, chlorophyll content and the plant defense enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase (FAL) were evaluated. The use of the rosemary-based chemical and organic formulates at 6% concentration reduced AACPD by 37% and 35%, respectively. There was an increment in peroxidase activity, locally and systemically, on the 1st day after treatment at the 6% concentration of the chemical formulation, and the local activity of the enzyme extended until the 2nd day after treatment with an increase of over 60% compared to the control. The 6% concentration of the organic formulation promoted an increase in local peroxidase activity on the 2nd day after treatment, with an increase of over 62% compared to the control. For FAL activity, all tested concentrations of the chemical formulation increased the enzymatic activity both locally and systemically 24 h after treatment, but the 6% and 4% concentration maintained a local peak on days 2 and 3 after treatment, respectively, with an increase over 50% higher than the control. The organic formulation promoted local activity of FAL on the 1st day after treatment in the 4% and 6% concentration, with an increase of over 64% compared to the control. All concentrations of the organic formulation promoted an increase in FAL activity from day 1 to day 2 after treatments. The polyphenoloxidase enzyme was not altered with the application of the formulations. Thus, foliar fertilizer containing *R. officinalis* controls black rot in cabbage leaf, possibly by inducing resistance.

Keywords: *Brassica oleracea*. Black rot. Resistance induction.

3 INTRODUÇÃO

Brassica oleracea L. var. *acephala* é uma hortaliça folhosa de elevado valor nutricional, caracterizada pela grande diversidade da espécie, com mais de 50 variedades. Seu cultivo é feito em sua grande maioria em unidades familiares e de forma intensiva, visando a obtenção de altas produções (SEDIYAMA; SANTOS; LIMA, 2014).

Alguns problemas fitossanitários têm limitado os rendimentos da couve folha, como a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que reduz significativamente a produtividade e o valor econômico do produto final, e aumenta os custos de produção pelo alto aporte de insumos químicos utilizados durante todo o ciclo da cultura com intuito de prevenir e ou controlar está doença (MARINGONI; SILVA JÚNIOR, 2016), em alguns casos, pode ocorrer perda total na colheita (MAJI; NATH, 2015).

O uso de agrotóxicos é o método de controle de doenças de plantas mais comum. No entanto, o uso indiscriminado dessa forma de controle pode selecionar populações de patógenos resistentes e causar problemas de contaminação ambiental e desequilíbrio ecológico (FRANZENER et al., 2018). Em paralelo, o consumidor tem exigido cada vez mais alimentos saudáveis, sustentabilidade ambiental e proteção à biodiversidade, tornando a busca por antimicrobianos naturais uma necessidade.

Nesse contexto, uma linha de controle alternativa que tem mostrado estudos muito promissores para o manejo de doenças é o uso de metabólitos vegetais que podem induzir resistência em plantas (STANGARLIN et al., 2011), a qual consiste na ativação de mecanismos latentes de defesa vegetal em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos (extratos de plantas medicinais) ou abióticos (OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016).

Extratos ou óleo essencial das plantas medicinais apresentam grande número de metabólitos secundários com atividade biológica em sua composição, o que têm demonstrado potencial para controlar fitopatógenos, seja pela atividade antimicrobiana direta, seja pela ativação de mecanismos de defesa nas plantas (STANGARLIN et al., 2011).

A planta medicinal *Rosmarinus officinalis* (alecrim) apresenta compostos como cineol, pipeno, canfeno e cânfora considerados antibacterianos (NIETO; ROS; CASTILLO, 2018). Extratos e óleos essenciais de *R. officinalis* tem sido também eficientes para o controle de outros patógenos como *Macrophomina phaseolina* em soja (LORENZETTI; STANGARLIN; KUHN, 2017), *Plasmopara viticola* e *Pseudocercospora vitis* em videira (MAIA et al., 2014), *Colletotrichum musae* em banana (LORENZETTI et al., 2019) e *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* em tomateiro (ASSI et al., 2018). No entanto, não há relatos do uso do alecrim no controle da podridão negra em couve folha.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos formulados químico e orgânico a base de *R. officinalis* no controle da bactéria *X. campestris* pv. *campestris* e na indução de mecanismos de resistência em couve folha.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação climatizada localizados na Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon/PR (24° 33' 40" de latitude Sul e 54° 04' 12" de longitude Oeste), no período de junho 2019 a outubro 2020.

4.1 PATÓGENO E TRATAMENTOS

O patógeno foi isolado a partir de lesões em folhas de couve folha com sintomas característicos da podridão negra causada por *X. campestris* pv. *campestris*, provenientes de cultivo comercial no município de Marechal Cândido Rondon/PR, conforme metodologia proposta por Mafia; Alfenas; Gonçalves (2016).

Fragments de folhas foram retirados na área de transição do tecido sadio/doente, em seguida imergidos em solução aquosa de etanol 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 1 min e enxaguados em água destilada. Após a desinfestação superficial procedeu-se a homogeneização em tubos contendo solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada, e em seguida, com alça de platina transferiu-se uma alíquota do homogeneizado para placas de Petri contendo meio ágar nutriente (23 g de ágar nutriente, 1000 mL de ADE). As placas foram mantidas em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) por 48 h, temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h e preservadas em solução salina 0,85% a 10 °C.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: formulado químico All Crim ConvencionalTM composto por fontes minerais de nitrogênio (1%), cobre (5%) e cálcio (29%), e formulado orgânico All Crim OrgânicoTM composto por fontes orgânicas de nitrogênio (1,87%), cálcio (0,37%), potássio (1,13%) e fósforo (0,36%), ambos com pó solúvel de alecrim. Os dois formulados foram utilizados nas concentrações 0% (apenas água destilada); 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6% (massa/volume).

4.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As sementes de couve folha foram semeadas em bandejas de poliestireno expandida com 128 células contendo o substrato vermiculita expandida. Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 5 L preenchidos com mistura de solo, areia e matéria orgânica na proporção de 2:1:1 (v/v/v), autoclavados a 120 °C durante 1 h a 1 atm. A irrigação foi efetuada diretamente no solo duas vezes por dia.

Quinze dias após o transplante, as plantas foram aspergidas com os formulados químico e orgânico nas concentrações indicadas até o ponto de escorrimento. Três dias após os tratamentos, as plantas foram inoculadas com *X. campestris* pv. *campestris* (1×10^8 UFC mL⁻¹) e mantidas em câmara úmida por 24 h (MAFIA; ALFENAS; GONÇALVES, 2016). Tanto os tratamentos quanto a inoculação foram efetuados ao final da tarde. Nos tratamentos e na suspensão bacteriana foram adicionados espalhante adesivo (Tween 80) a 0,1%.

As avaliações de severidade da doença iniciaram-se com o surgimento dos sintomas, oito dias após a inoculação, totalizando quatro avaliações. A severidade da doença foi estimada com auxílio de escala diagramática (NUÑEZ et al., 2017). Com os dados obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela equação proposta por Shaner e Finney (1977),

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde:

Y_i e Y_{i+1} : severidade da doença na época de avaliação;

T_{i+1} e T_i : são os intervalos entre as avaliações;

n: número de observações.

Ao longo de 20 dias foram determinadas o índice de clorofila nas folhas de couve utilizando o medidor portátil SPAD-502. A primeira leitura foi realizada no dia da aplicação do tratamento e as demais no intervalo de três dias até o término do experimento.

Após o término do experimento, 35 dias após o transplante, foram realizadas avaliações das variáveis: massas frescas e seca da parte aérea; volume de raízes (em proveta graduada contendo volume conhecido de água); e área foliar (*Area Meter* - modelo LICOR LI-3000).

4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Para esse experimento, as mudas de couve foram produzidas conforme indicado no item 4.2. Após sete dias foram transplantadas para copos de poliestireno expandido de 500 mL contendo substrato e húmus (proporção de 2:1), dispostos em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (luz led branca 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Sete dias após o transplante iniciou-se a coleta de duas folhas por planta (folha tratada e inoculada e a uma folha acima não tratada e inoculada) nos tempos 0 (zero) (dia do tratamento), 1; 2; 3 (dia da inoculação, conforme item 5.2), 6 e 9 dias após a inoculação. Como as amostras eram destrutivas, em cada dia da coleta eram retiradas 24 amostras totalizando 288 unidades amostrais para cada ensaio. Durante as coletas, cada amostra foi imediatamente acondicionada em papel alumínio, identificada e armazenada a -20 °C.

As amostras de folhas foram homogeneizadas mecanicamente em almofariz com nitrogênio líquido e posteriormente adicionou-se 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). O homogeneizado foi centrifugado a 6.000g durante 20 min a 4 °C (STANGARLIN; PASCHOLATI; FRANZENER, 2005). O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi transferido para microtubos e armazenado a -20 °C, e posteriormente utilizado para determinação do conteúdo proteico total e atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A mistura consistiu de 50 μL do extrato enzimático, 750 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μL do reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250; 125 mL etanol; 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 250 mL de água destilada). Após o reagente ser adicionado sob agitação e as amostras serem incubadas por 5 min, realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 595 nm. Para cada amostra foram feitas três réplicas. Os valores de absorbância foram plotados em curva padrão de albumina de soro bovino (ASB).

A atividade da peroxidase foi determinada à 30 °C por método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUC, 1982). A mistura da reação continha 100 μL do extrato enzimático e 900 μL do substrato para enzima (12,5 mL de guaiacol a 2% e 310 μL de peróxido de hidrogênio P.A. em 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). A reação foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, por 2 min, com leituras em intervalos de 15 seg. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade das polifenoloxidase (PFO) foi determinada de acordo com Duangmal; Apenten (1999), pela mensuração da oxidação do catecol convertido em quinona. O substrato para enzima foi composto por 110,1 mg de catecol dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), formando uma solução de catecol 0,02 M. Para a reação, que ocorreu a 30 °C, foram misturados 900 µL do substrato com 100 µL do extrato enzimático. As leituras foram realizadas a cada 15 seg a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. Os resultados obtidos foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha 50 µL do extrato enzimático, 450 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 de L-fenilalanina diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi incubada a 40 °C por 2 h. Após esse período, foi adicionado 60 µL de HCl 5 M para cessar a reação e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle (50 µL de extrato enzimático e 950 µL de tampão Tris-HCl 0,0025 M (pH 8,8)). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, utilizando uma curva padrão para o ácido.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em blocos casualizados. Os experimentos possuíram seis tratamentos representados pelos formulados químico e orgânico a base de alecrim nas concentrações 0%; 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6%, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) a ($p \leq 0,05$) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Os tratamentos foram comparados com a testemunha (água) pelo teste de Dunnet a ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada no software livre Genes (CRUZ, 2013). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM COUVE FOLHA À *X. campestris* pv. *campestris* UTILIZANDO OS FORMULADOS DE *R. officinalis*

Para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) houve efeito quadrático em função das concentrações dos formulados a base de alecrim para controle da podridão negra da couve folha. O ponto de mínima calculado foi para a concentração 5,11% do formulado

químico, apresentando a menor AACPD, enquanto no formulado orgânico foi para a concentração 4,92% (Figura 1).

A redução da severidade, quando comparado à testemunha, foi de 35,03% e 37,54% com o uso dos formulados orgânico e químico, respectivamente nas plantas tratadas na concentração de 6%. De acordo com Negreiros et al. (2013), a diminuição da AACPD tenha ocorrido devido a presença de metabólitos secundários sintetizados pela planta hospedeira ou ainda devido a mecanismos de defesa estruturais, como a lignificação, produzidos na couve em função do tratamento com os formulados.

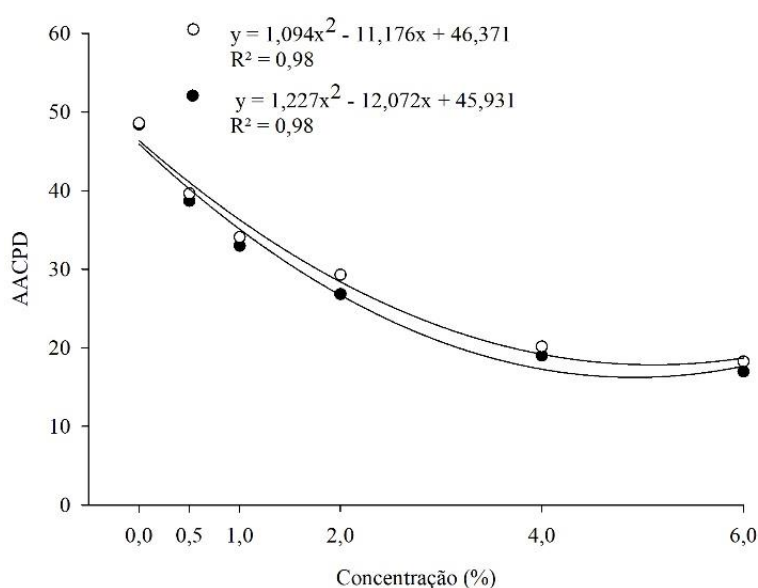


Figura 1 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve folha (*Brassica oleracea*) tratada com fertilizantes foliares químico e orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (●) Formulado químico CV = 15,67% e (○) formulado orgânico CV = 10,86%.

Os formulados possuem em sua composição, além do pó solúvel de alecrim, nutrientes como nitrogênio, potássio, cobre, cálcio e fósforo. Os elementos minerais estão envolvidos em todos os mecanismos de defesa da planta como componentes integrais ou ativadores enzimáticos, inibidores e reguladores de metabolismo (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Além disso, podem aumentar a resistência das plantas aos patógenos por modificações na anatomia e nas propriedades fisiológicas e bioquímicas (LORENZETTI et al., 2021).

A eficiência de alecrim na redução da AACPD contra bactérias fitopatogênicas foi confirmada por Assi et al. (2018), os quais observaram menor intensidade de doença quando utilizaram a formulação de pó solúvel de alecrim na concentração de 130 mg L^{-1} , com redução de 62,76% da mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) no tomateiro. Em outro

patossistema, os formulados de alecrim, tanto líquido quanto em pó, foram capazes de reduzir os sintomas da antracnose (*Colletotrichum musae*) em banana em 14,31% e 29%, respectivamente (LORENZETTI et al., 2019).

Os formulados orgânico e químico a base de alecrim não interferiram nos parâmetros vegetativos massas fresca e seca da parte aérea, volume de raiz e área foliar das plantas de couve folha, independentemente da concentração (Tabela 1).

Tabela 1 - Massas fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea, volume de raiz (VR) e área foliar de couve folha tratada com concentrações dos formulados químico e orgânico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Concentração (%)	MFPA (g)		MSPA (g)		VR (mL)		Área foliar (cm ²)	
	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico
0,0	68,78 ^{ns}	76,55 ^{ns}	8,50 ^{ns}	8,15 ^{ns}	44,00 ^{ns}	35,00 ^{ns}	1148,71 ^{ns}	1345,25 ^{ns}
0,5	72,25	71,43	8,91	7,18	41,50	39,00	1242,52	1304,75
1,0	65,10	70,48	7,97	7,38	37,00	35,50	1097,50	1231,22
2,0	69,45	71,53	8,48	7,41	46,50	38,50	1194,13	1282,90
4,0	68,58	71,68	8,43	7,38	45,00	46,00	1160,70	1240,07
6,0	69,78	69,78	8,10	7,50	38,50	34,50	1196,95	1256,33
CV (%)	8,81	9,95	7,14	11,72	14,71	18,75	7,65	9,22

Médias não significativas pelo teste de variância a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo. CV = coeficiente de variação.

Resultados semelhantes foram observados por Medeiros (2015), após o uso do óleo essencial de alecrim na concentração 1%, aplicados semanalmente, diretamente sobre as folhas de couve manteiga, 20 dias após o transplante, concluindo que o método alternativo utilizado não influenciou nas características agrônômicas avaliadas, embora tenha induzido a atividade da enzima peroxidase, ou seja, a aplicação do óleo essencial de alecrim incrementou a atividade da enzima, corroborando com os resultados encontrados no experimento. As aplicações dos formulados a base de alecrim também não alteraram os teores de clorofila (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de clorofila (unidade SPAD) na sexta folha de couve em função do tratamento com concentrações dos formulados químico e orgânico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Concentração (%)	1° AV		2° AV		3° AV		4° AV		5° AV	
	QUÍ.	ORG.	QUÍ.	ORG.	QUÍ.	ORG.	QUÍ.	ORG.	QUÍ.	ORG.
0,0	41,18 ^{ns}	40,95 ^{ns}	43,5 ^{ns}	40,93 ^{ns}	41,6 ^{ns}	39,33 ^{ns}	40,60 ^{ns}	40,08 ^{ns}	29,23 ^{ns}	33,13 ^{ns}
0,5	40,13	39,30	43,35	41,48	41,73	40,13	41,63	41,03	30,23	33,33
1,0	41,18	38,25	42,38	40,23	42,35	40,18	41,40	38,95	31,53	31,95
2,0	41,70	39,00	43,03	40,43	41,85	39,90	41,13	40,08	32,15	32,38
4,0	41,65	39,80	42,85	41,53	42,25	40,18	41,68	39,35	32,45	32,20
6,0	40,88	41,00	43,33	41,13	42,75	40,75	41,68	41,55	33,88	35,38
CV (%)	2,81	3,80	2,87	4,60	2,03	3,72	2,92	3,08	6,90	5,12

Médias não significativas pelo teste de variância a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo. CV = coeficiente de variação. 1° AV até 5° AV = número de avaliações consecutivas.

Para que ocorra a indução de resistência é necessário que haja acúmulo de reservas, já que ocorre um gasto energético para a planta quanto esta necessita da ativação de suas defesas (GAYLER et al., 2004), conforme poderá ser verificado a seguir nas análises enzimáticas. Entretanto, o uso dos formulados a base de alecrim em todas as concentrações não proporcionaram incremento no teor de clorofila.

Dessa forma, sugere-se que outros fatores podem estar envolvidos que não o incremento no teor de clorofilas, como por exemplo, incremento na atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RUBISCO), uma vez que, houve incremento da atividade enzimática, necessitando, portanto, incremento no sistema de fornecimento de energia metabólica. Stangarlin; Pascholati (2000) observaram redução na concentração no teor de clorofila total em feijoeiro inoculado com *Uromyces appendiculatus*, entretanto, houve indução das enzimas de defesa da planta, podendo estar relacionado com o incremento nos valores de atividade total da RUBISCO.

No entanto, os resultados indicam que não ocorreu custo energético, uma vez que os tratamentos não influenciaram nas características agrônomicas e no teor de clorofila, mas, induziram a resistência em couve folha resultando em redução da severidade da doença. De acordo com Kuhn; Pascholati (2010), o custo energético ocorre quando a planta gasta sua energia com ativação de mecanismos de defesa, com conseqüente redução do crescimento e produtividade.

5.2 BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As folhas de couve tratadas com o formulado químico de alecrim apresentaram concentrações maiores da peroxidase em seus tecidos quando comparadas com a testemunha (Figura 2A). Entretanto, a concentração 6% foi a única que promoveu incremento na atividade no 1º dia após o tratamento, estendendo-se até o 2º dia. Porém, as demais concentrações (0,5%, 1% e 4%) demonstraram incremento acentuado no 2º dia após o tratamento, incremento este que foi em média 61,85% maior que a testemunha. Ao 3º dia houve decréscimo na atividade em todos os tratamentos, não diferindo estatisticamente da testemunha, com exceção da concentração 2%.

O fato do primeiro pico de atividade ter ocorrido do 1º até o 3º dia após os tratamentos pode estar relacionado ao efeito indutor dos mesmos, uma vez que, mesmo ainda não tendo ocorrido a inoculação do patógeno, observa-se que a atividade de peroxidase tende a voltar a concentração basal. Entretanto, após a inoculação, que ocorreu no 3º dia após o tratamento, e

considerando o intervalo da infecção até o início do processo infeccioso, notou-se a ocorrência do segundo pico de atividade da peroxidase (Figura 2A).

Verificou-se incremento de atividade da peroxidase de forma sistêmica no 1º dia após o tratamento com formulado químico a base de alecrim na concentração de 6% (Figura 2B). Para as concentrações 2% e 4% houve acréscimo da atividade no 2º dia. Para os tratamentos 0%, 0,5% e 1% não houve diferença estatística (Figura 2B), ou seja, não houve indução de resistência nas plantas de couve a ponto de elevar a atividade da enzima peroxidase de forma sistêmica.

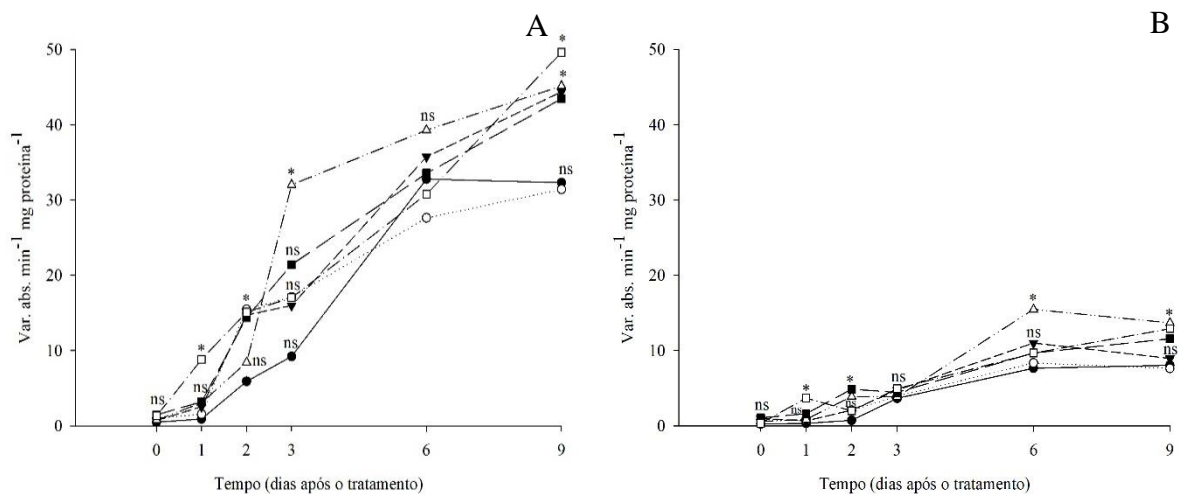


Figura 2 - Atividade de peroxidase em folhas de couve tratadas com formulado químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (·····○·····), 1% (---▼---), 2% (---△---), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três dias após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

Para o tratamento com formulado orgânico a base de alecrim, a concentração 6% foi a única que promoveu incremento na atividade no 2º dia após o tratamento, com valor 62,18% maior que a testemunha (Figura 3A). Posteriormente, nos 3º e 6º dias todos os tratamentos não diferiram entre si. Esse mesmo tratamento também ocorreu de forma sistêmica com aumento da atividade da enzima peroxidase, porém, no 3º dia (Figura 3B). As demais concentrações não induziram a atividade da peroxidase. O segundo pico da atividade da peroxidase ocorreu no 9º dia, tanto de forma local quanto sistêmica, com o início do processo infeccioso.

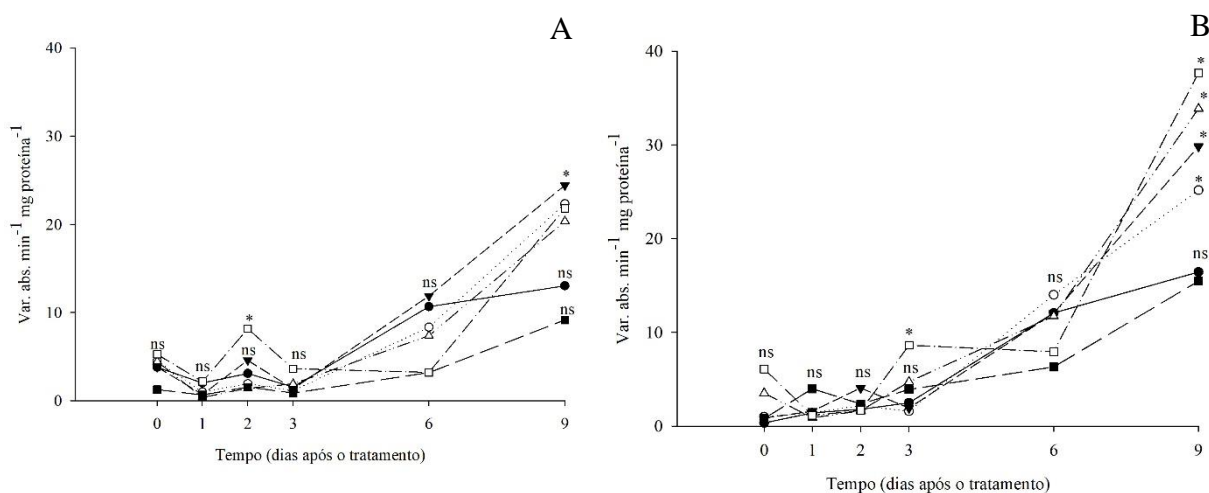


Figura 3 - Atividade de peroxidase em folhas de couve tratadas com formulado orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (·····○·····), 1% (---▼---), 2% (---△---), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três dias após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

A atividade da peroxidase na concentração mais elevada dos formulados químico e orgânico ocorreu em dois picos, sendo um pico inicial que pode caracterizar um *priming* seguido de um pico mais elevado que se manifesta após o início do processo infeccioso. Dessa forma, a planta permanece em estado de alerta “*priming*” e os mecanismos de resistência são ativados mais rapidamente na presença do patógeno (PASCHOLATI; DALIO, 2018). A atividade da peroxidase logo após o tratamento, mesmo que baixa, pode ter relação com a predisposição à resistência, acarretando um maior incremento com a chegada do patógeno, quando se inicia o processo infeccioso (LORENZETTI; STANGARLIN; KUHN, 2018).

De acordo com Stangarlin et al. (2011), a atividade de peroxidase eleva a taxa de lignificação, por meio da oxidação de álcoois fenólicos, atuando de forma preventiva. O aumento da atividade da peroxidase pode estar associado a biossíntese de lignina que atua nas células vizinhas às infectadas, as quais direcionam um sistema de defesa na área da infecção, consequentemente, dificultando a penetração do patógeno pela parede celular e a difusão de toxinas liberadas pelo mesmo.

Ademais, a peroxidase pode funcionar como chave reguladora de uma ampla variedade de processos fisiológicos que necessitam de elementos minerais, como os disponíveis nesses formulados, como nitrogênio, potássio, cobre, cálcio e fósforo, para realizar diversos mecanismos e ações exercidas pelas plantas como a senescência, fotorespiração e fotossíntese, movimento estomático, ciclo celular, crescimento e desenvolvimento celular (QUAN et al., 2008).

Em relação a atividade da polifenoloxidase, esta permaneceu constante, ou seja, não houve diferença independente das concentrações dos formulados químico e orgânico utilizados no presente trabalho. Medeiros (2015), utilizando óleos essenciais de alecrim na concentração 1% em couve manteiga, observou que não houve diferença significativa para a atividade da polifenoloxidase, embora tenha aumentado a atividade da enzima peroxidase.

A polifenoloxidase pode ser inibida por vários agentes quelantes tais como cianeto, monóxido de carbono, tropolona, 2-marcaptobenzotiazol, azida, ácido cítrico e ácido etileno diamino tetra cético (EDTA) (MCEVILY; IYENGAR; OTWELL, 1992). O ácido ascórbico (vitamina C) e seus vários sais neutros são os principais antioxidantes que podem reagir irreversivelmente com as *o*-quinonas anulando o efeito da polifenoloxidase pelo sequestro do cobre (SAPERS; MILLER, 1998).

Tudela, Espín e Gil (2002) relataram que quanto maior o teor de vitamina C em batatas minimamente processadas, menor é sua suscetibilidade ao escurecimento através da polifenoloxidase. Simões et al. (2015), observaram que os altos teores de vitamina C em folhas de couve não apresentaram polifenoloxidase no início do armazenamento, no entanto, com o decréscimo da vitamina C verificaram atividade da enzima.

Para a fenilalanina amônia-liase (FAL), nas folhas tratadas, verificou-se que todas as concentrações do formulado químico incrementaram a atividade enzimática no 1º dia após o tratamento, com exceção da testemunha que não teve diferença significativa (Figura 4A). Entretanto, as concentrações 6% e 4% mantiveram o pico nos 2º e 3º dias após o tratamento, respectivamente, incremento este que foi em média 51,02% maior que a testemunha. Portanto, o primeiro pico ocorreu no 1º dia e depois no 3º dia após o tratamento (Figura 4A), podendo este estar relacionado com o efeito indutor do tratamento. Após a inoculação da bactéria verificou-se no 9º dia a ocorrência do terceiro pico de atividade, momento em que provavelmente estaria ocorrendo a colonização do patógeno.

A folha acima não tratada com formulado químico e inoculada, apresentou picos na atividade de FAL de forma sistêmica no 1º dia após o tratamento em todas as concentrações (Figuras 4B). Entretanto, a concentração 6% foi a única que promoveu incremento significativo na atividade desta enzima, sendo este aumento de 40% no 6º dia. Este pico da atividade da FAL pode estar relacionado ao processo infeccioso e à indução de resistência, já que a atividade foi verificada apenas para a concentração 6% do formulado químico.

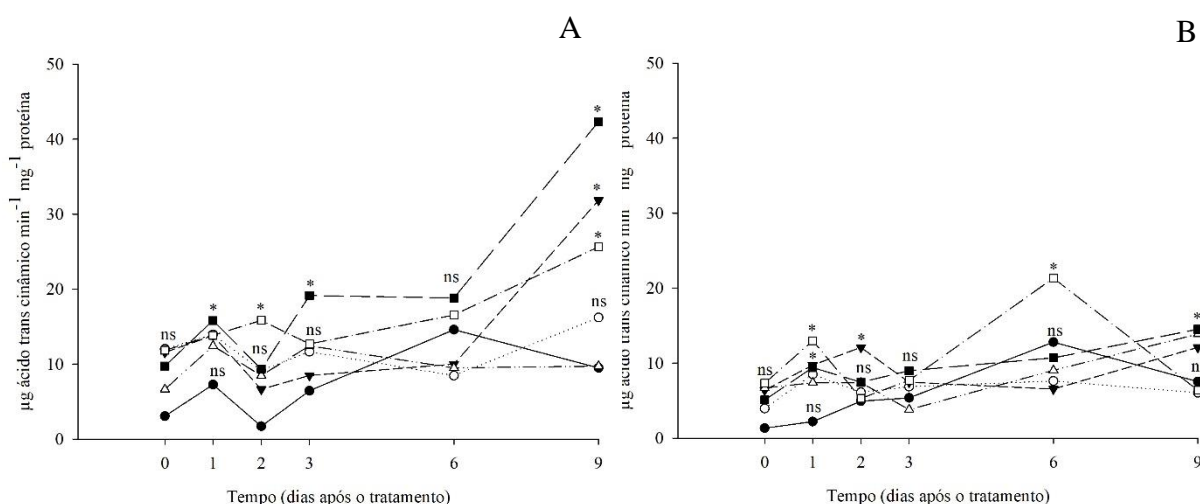


Figura 4 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de couve tratadas com formulado químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (.....○.....), 1% (---▼---), 2% (—△—), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três dias após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

A elevada atividade de FAL em todas as concentrações pode estar relacionada ao cobre presente no formulado químico. O cobre tem sido associado a resistência a determinadas bacterioses e esse efeito parece estar associado à inibição das peroxidases e catalases, resultando no acúmulo de peróxidos que possui ação bactericida. Esse decréscimo da atividade da peroxidase resulta no acúmulo de compostos fenólicos, considerados com potencial efeito bactericida (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993). Esse fato pode explicar os baixos incrementos da enzima peroxidase nos tratamentos com formulado químico.

Em relação a FAL nas folhas de couve tratadas com formulado orgânico, as concentrações 4% e 6% promoveram incremento significativo na atividade enzimática (Figura 5A), sendo este aumento de 64,29% no 1º dia após o tratamento. Para essas duas concentrações do formulado, verificaram-se dois picos de indução. O primeiro ocorreu 24 horas após o tratamento, podendo estar relacionado com o efeito indutor do mesmo, pois não ocorrendo a inoculação verifica-se que a atividade tendeu a voltar a concentração basal, haja vista que nos 3º e 6º dias os tratamentos não diferiram entre si. O segundo pico da atividade da enzima, que ocorreu no 9º dia, pode estar relacionado não somente ao processo infeccioso, mas também ao processo de indução de resistência, já que a atividade foi verificada nas concentrações 4% e 6% do formulado orgânico.

A folha acima não tratada com formulado orgânico e inoculada (Figura 5B) apresentou dois picos na atividade de FAL, ou seja, de forma sistêmica, nos 1º e 2º dias em todos os tratamentos, diferindo-se da testemunha. Entretanto, a concentração 6% permaneceu constante

até 3º dia após o tratamento. No 9º dia, em função do processo infeccioso da bactéria e da indução de resistência promovida pelo tratamento, ocorreu o segundo pico em todas as concentrações do formulado orgânico.

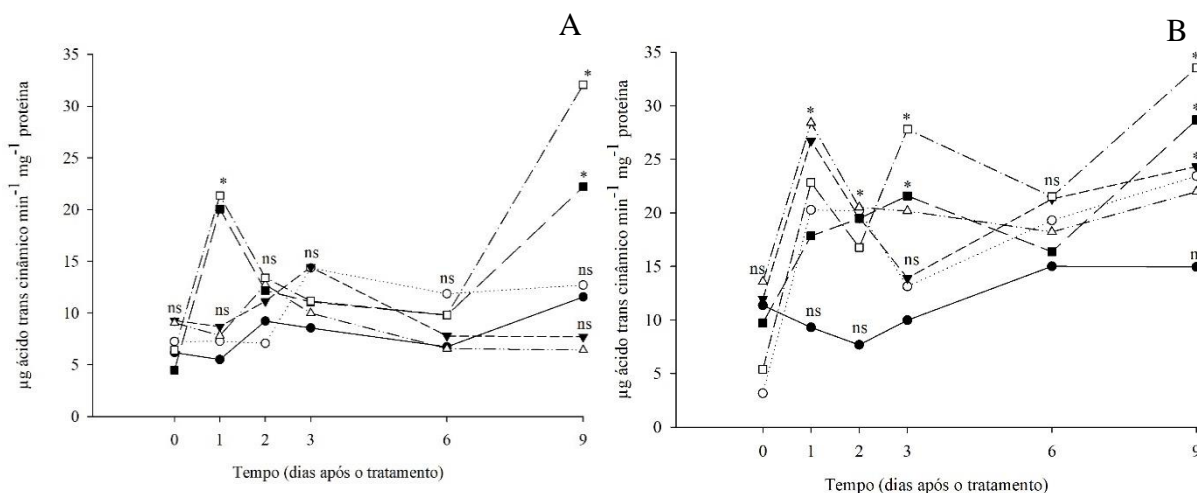


Figura 5 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de couve tratadas com formulado orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (—○—), 1% (—▼—), 2% (—△—), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculado com *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três dias após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

Os teores elevados de FAL podem estar relacionados a presença do potássio no formulado orgânico, pois este nutriente, além de possuir uma elevada mobilidade na planta, favorece a produção de aminoácidos como a fenilalanina. Franceschi et al. (2018), observaram que o fosfito de potássio na concentração 0,008% induziu resistência pela ativação das enzimas FAL, peroxidase e quitinase, ativando a rota dos fenilpropanóides, ou seja, mecanismos que envolvem a síntese de lignina e compostos fenólicos foram potencializados. Esta rota é confirmada pela ativação das duas enzimas envolvidas em sua expressão, FAL e peroxidase.

As folhas de couve tratadas com os formulados químico e orgânico apresentaram incremento da atividade de FAL. Essa enzima é reguladora da síntese de compostos fenólicos, sendo estes precursores da lignina e do ácido salicílico, que atuam na defesa estrutural e no processo de sinalização da resposta sistêmica, respectivamente (BONAS; LAHAYE, 2002). Tal fato foi verificado por Almeida et al. (2012), quando afirmaram que a fenilalanina amônia-liase é uma das enzimas-chave na rota dos fenilpropanoides, responsável pela desaminação da L-fenilalanina com consequente formação do ácido trans-cinâmico que influencia na síntese de flavonoides e isoflavonoides.

A FAL também é precursora da síntese de pigmentos como as antocianinas, que auxiliam na proteção contra estresses abióticos e bióticos. Além disso, promove aumento da atividade e, consequentemente, aumento da síntese de substâncias fenólicas como a molécula

senalizadora ácido salicílico e substâncias de defesa com algumas fitoalexinas e ligninas, além de fenóis antimicrobianos como ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido sinápico, que podem ser tóxicos aos patógenos (MARIANGEL et al., 2013).

A FAL é de extrema importância para o desenvolvimento da planta, como exemplo, a regulação do alongamento e ligação entre os polissacarídeos de parede celular, entretanto, para realizar esses mecanismos e ações exercidas pela planta em ambiente de estresse, é essencial a absorção de macro e microelementos (GUIMARÃES et al., 2015). Como os formulados químico e orgânico dispõem desses minerais como o nitrogênio, potássio, cobre, cálcio e fósforo, isto poderia justificar também a indução de resistência nas plantas de couve folha.

O cálcio presente tanto no formulado químico quanto no orgânico pode ter favorecido não só a nutrição da planta, mas também, no reconhecimento da bactéria, sendo assim, ativando os mecanismos de resistência latentes no momento do processo infeccioso, pois esse nutriente está envolvido no reconhecimento pela membrana plasmática vegetal de patógenos invasores, atuando assim como mensageiro secundário (MARSCHNER, 2012). A redução das doenças pelo nitrogênio resulta, geralmente, da influência de formas específicas desse nutriente, em rotas metabólicas diferentes, alterando o crescimento de constituintes da planta ou exsudados, por exemplo, o decréscimo dos teores de fenóis, em algumas plantas, está associado ao NO_3^- que inibe a síntese de fenóis, o que não ocorre com a forma NH_4^+ (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

Além disso, o próprio alecrim presente nos formulados pode ter induzido a resistência nas plantas, já que muitos extratos de plantas apresentam atividade eliciadora. Acredita-se que devido possuírem ampla gama de moléculas advindas dos fragmentos de células da planta, os extratos vegetais, quando aplicados na superfície de outra planta, sinalizam a presença de células danificadas, ativando respostas de resistência, mediadas pelo ácido salicílico, atuando como sinais de auto-danificação inespecíficos (HEIL, 2012).

Há a necessidade de novos estudos com formulados orgânicos de alecrim, uma vez que este se mostrou eficiente no presente trabalho. Este é um método alternativo bastante promissor no controle de doenças, visto que existem estudos que mencionam que o uso de extratos vegetais conserva algumas das substâncias sintetizadas no metabolismo secundário das plantas e pode constituir formas de controle alternativo ou preventivo contra fitopatógenos. Este controle pode ocorrer tanto por ação antimicrobiana diretamente sobre o patógeno ou induzindo resistência nas plantas, devido as características eliciadoras (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2003).

6 CONCLUSÃO

Os formulados a base de alecrim promoveram redução na severidade da podridão negra em folhas de couve, em média de 35% e 37% para orgânico e químico, respectivamente. Os formulados não ocasionaram custo energético na indução de resistência. A concentração 6% dos formulados proporcionou o melhor resultado, induzindo as atividades de peroxidase e fenilalanina amônia-liase, tanto local quanto sistemicamente em couve folha desafiada com *X. campestris* pv. *campestris*. Isto indica a ação de eliciadores presentes nestes formulados a base de alecrim, com efeito dose-dependente para a ativação desses mecanismos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. O.; MARQUES, A. R.; T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, R. S.; GUIMARÃES, F. C. M.; ABDELNOOR, R. F.; PEREIRA, P. R. G.; PEREIRA, M. C. B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 47, n. 2, p.163- 172, mar./fev. 2012.

ASSI, L.; VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUNH, O. J.; MEINERZ, C. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de pinta preta e de mancha bacteriana em tomateiro por extrato formulado de *Rosmarinus officinalis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 44, n. 4, p. 355-360, abr./set. 2018

BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.5, n. 1, p. 44-50, Feb./Mar. 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Sep./May. 1976.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v. 35, n. 3, p. 271-276, Jul./Sep. 2013.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanun tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 3, p. 351-359, Feb./May. 1999.

FRANCESCHI, V.; CRUZ, M. da; DALACOSTA, N.; BRUZAMARELLO, J.; SANTOS, S. dos; STEFENI, A. R.; MAZARO, S. M.; KOLTZ, E.; PEREIRA, M. Potassium phosphite in resistance induction of green mold in post-harvest of “Ponkan” tangerina. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Jordan, v. 12, n. 2, p. 1-5, Jan./Mar. 2018.

FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MOURA, G. S.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 44, n. 1, p. 10-16, Feb./Mar. 2018.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 363-371, Apr./May. 2004

GUIMARÃES, S. S.; MAZARO, S. M.; FREDDO, Á. R.; WAGNER JÚNIOR, A. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 17, n. 1, p.143-149, jun./jan. 2015.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 73-82, Sep./Jan. 1982.

HEIL, M. Damaged-self recognition as a general strategy for injury detection. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 7, n. 5, p. 576–580, Feb./Jun. 2012.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactérias *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 36, n. 2, p. 107-114, out./jun. 2010.

LORENZETTI, E.; SOUZA, D. H. G.; TARTARO, J.; STANGARLIN, J. R.; BRAGA, G. C. Formulado de alecrim no controle de antracnose e conservação em pós-colheita de banana nanica. **Multi-Science Journal**, Urutaí, GO, v. 2, n. 2, p. 16-19, jun./ago. 2019.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J. Antifungal activity of rosemary extract on *Macrophomina phaseolina* and charcoal rot control in soybean. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 99, n. 3, p. 777-780, Feb./Jun. 2017.

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

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; CARVALHO, J. C.; HENDGES, C.; MATA, T. C.; ALVES NETO, A. J.; KOHLER, T. R.; TARTARO, L.; RITTER, G.; BRITO, O. D. C.; BELMONTE, C.; FEROLDI, L. T.; CECATTO JUNIOR, R. Calcium, copper, manganese and zinc and plant diseases: a review. **Australian Journal of Crop Science**, Austrália, v. 15, n. 5, p. 638-642, Dec./Mar. 2021

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 6, p. 145-170.

MAIA, A. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. R.; FARIA, C. M. D. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; JARDINETTI, V. A.; BATISTA, B. N. Óleos essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, v. 49, n. 5, p. 330-339, fev./abr. 2014.

MAJI, A.; NATH, R. Pathogenecity test by using different inoculation methods on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* caused of black rot of cabbage. **International Journal of Research in Applied Natural and Social Sciences**, Tunis, v. 3, n. 2, p. 53-58, Dec./Feb. 2015.

MARIANGEL, E.; REYES-DIAZ, M.; LOBOS, W.; BENSCH, E.; SCHALCHLI, H.; IBARRA, P. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. **Ciência e Investigación Agraria**, Santiago, v.40, n.1, p. 161-170, Jan./Apr. 2013.

MARINGONI, A. C.; SILVA JÚNIOR, T. A. F. Doenças das brássicas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v. 2, p. 165-173.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Academic Press, 2012. 651 p.

MCEVILY, A. J.; IYENGAR, R.; OTWELL, W. S. Inhibition of enzymatic Browning in foods and beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Reino Unido, v. 32, n. 3, p. 253-273, Sep./Dec.1992

MEDEIROS, C. **Alterações bioquímicas e fisiológicas em couve submetidas à aplicação de óleos essenciais e húmus de minhoca**. 2015. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

NEGREIROS, R. J. Z.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, O. L.; CECON, P. R.; SIQUEIRA, D. L. de. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas 'Prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 35, n. 1, p. 51 -58, fev./mar. 2013.

NIETO, G.; ROS, G. CASTILLO, J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): a review. **Medicines**, Basel v. 5, n. 3, p. 1-13, Jun./Sep. 2018.

NUÑEZ, A. M. P.; MONTEIRO, F. P.; PACHECO, L. P.; RODRÍGUEZ, G. A. A.; NOGUEIRA, C. C. A.; PINTO, F. A. M. F.; MEDEIROS, F. H. V. de; SOUZA, J. T. de. Development and validation of a diagrammatic scale to assess the severity of black rot of crucifers in kale. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 165, n. 3, p. 195-203, Jul./Jan. 2017.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**. Bari, v. 15, p. 152-158, Dec./Mar. 2016.

PASCHOLATI, S. F. P.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 424-452.

QUAN, L. J.; ZHANG, B.; SHI, W. W.; LI, H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 50, n. 1, p. 2-18, May./Jan. 2008.

SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 342-346, Apr./Jun. 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, Suplemento, p. 554-556, jan./jun. 2003.

SEDIYAMA, M. A. N.; SANTOS, I. C. dos; LIMA, P. C. de. Cultivo de hortaliças no sistema orgânico. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, Suplemento, p. 829-837, nov./dez. 2014.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow mild wing in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, p.1051-1055, Dec./Feb. 1977.

SIMÕES, A. N.; SILVINO, I. M.; MOSQUIM, P. R.; SOARES, N. F. F.; PUSCHMANN, R. The effect of storage temperature on the quality and phenolic metabolism of whole and minimally processed kale leaves. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v. 37, n. 1, p. 101-107, Jan./Mar. 2015.

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

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; FRANZENER, G. Phenols, β -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turcicum* in maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 31, n. 3, p. 261-267, Apr./Jul. 2005.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 16, p. 265-304, 2008.

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 Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, PR, v. 10, n. 1, p. 18-46, set./dez. 2011.

TUDELA, J. A.; ESPÍN, J. C.; GIL, M. I. Vitamin C retention in fresh-cut potatoes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 75-84, Sep./Aug. 2002.

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

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A Resistencia a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, DF, v. 1, p. 275-318, 1993.

CAPÍTULO III

FORMULADOS A BASE DE *Rosmarinus officinalis* PARA O CONTROLE DE *Alternaria brassicae* EM FOLHAS DE *Brassica oleracea* var. *acephala*

1 RESUMO

O uso intensivo de agrotóxicos no controle de doenças, onera os custos de produção, ocasiona seleção de patógenos resistentes, além de problemas sociais e ambientais. Dessa forma, tem-se buscado alternativas de proteção para as plantas contra as doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos formulados químico e orgânico a base de *Rosmarinus officinalis* no controle do fungo *Alternaria brassicae* e na indução de mecanismos de resistência em folhas de *Brassica oleracea* var. *acephala*. Para tanto, formulações contendo fontes química e orgânica de fertilizantes acrescidos de pó solúvel de *R. officinalis*, nas concentrações 0%, 0,5%, 1%, 2%, 4% e 6%, foram pulverizados na 3ª folha três dias antes da inoculação do patógeno que ocorreu nas 3ª e 4ª folhas. Foram avaliados a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massas fresca e seca de parte aérea e raiz, volume de raiz, área foliar, teor de clorofila e as enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (FAL). O uso dos formulados químico e orgânico a base de alecrim na concentração 6% reduziram a AACPD em 61,29% e 56,30%, respectivamente. Houve incremento na atividade de peroxidase na folha de couve tratada no 1º dia após o tratamento nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6% do formulado químico, com incremento de 61,31% em relação a testemunha. Na folha não tratada, a atividade da peroxidase foi induzida pelas concentrações 2%, 4% e 6%. No formulado orgânico, a concentração 6% foi única que induziu a atividade de peroxidase, observado nos 1º, 2º, 3º, 6º e 9º dias após o tratamento, com incrementos de 77,02%, 65,51%, 55,19%, 64,07% e 78,05%, respectivamente. Esta concentração, também induziu atividade da enzima de forma sistêmica. As concentrações 1%, 2%, 4% e 6% do formulado químico induziram a atividade de FAL tanto local quanto sistemicamente no 1º dia após o tratamento, com incremento de 65,94% na folha não tratada com formulado. O formulado orgânico também promoveu atividade local de FAL no 1º e 2º dias após o tratamento nas concentrações 4% e 6% com incremento de 70,64%. Esse formulado também induziu atividade sistêmica de FAL em todas as concentrações no 1º dia após o tratamento, com incremento de 54,40%. A enzima polifenoloxidase não foi alterada com a aplicação dos formulados. Os formulados induziram a atividade das enzimas peroxidase e FAL e reduziram a severidade da mancha de alternaria na couve folha.

Palavras-chave: Alecrim. Couve folha. Indução de resistência.

***Rosmarinus officinalis* BASED FORMULATIONS FOR THE CONTROL OF *Alternaria brassicae* on *Brassica oleracea* leaves**

2 ABSTRACT

The intensive use of agrochemicals to control diseases increases production costs, causes selection of resistant pathogens, in addition to social and environmental problems. Thus, alternatives for plant protection against diseases have been sought. The objective of this work was to evaluate the potential *Rosmarinus officinalis* based chemical and organic formulations to control the fungus *Alternaria brassicae* and induce resistance mechanisms in *Brassica oleracea* var. *acephala* leaves. To this end, formulations containing chemical and organic fertilizer sources plus soluble powder of *R. officinalis* at concentrations of 0%, 0.5%, 1%, 2%, 4% and 6% were sprayed on the 3rd leaf three days before inoculation of the pathogen that occurred on the 3rd and 4th leaves. The area under the disease progress curve (AUDPC), fresh and dry masses of aerial part and root, root volume, leaf area, chlorophyll content and the plant defense enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) were evaluated. The use of rosemary-based chemical and organic formulations at a concentration of 6% reduced AUDPC by 61.29% and 56.30%, respectively. There was an increase in the peroxidase activity in the treated cabbage leaf on the first day after treatment in the concentrations 1%, 2%, 4% and 6% of the chemical formulation, with an increase of 61.31% in relation to the control. In the untreated leaf, the peroxidase activity was induced by the concentrations 2%, 4% and 6%. In the organic formulation, the concentration of 6% was the only one that induced peroxidase activity, observed on the 1st, 2nd, 3rd, 6th and 9th days after treatment, with increases of 77.02%, 65.51%, 55.19%, 64.07% and 78.05%, respectively. This concentration also induced enzyme activity systemically. The 1%, 2%, 4% and 6% concentrations of the chemical formulation induced the activity of PAL both locally and systemically on the 1st day after treatment, with an increase of 65.94% in the leaf not treated with the formulation. The organic formulate also promoted local activity of PAL on the 1st and 2nd day after treatment at concentrations of 4% and 6% with an increase of 70.64%. This formulate also induced systemic activity of PAL in all concentrations on day 1 after treatment, with an increase of 54.40%. The polyphenoloxidase enzyme was not altered with the application of the formulates. The formulates induced the activity of peroxidase and PAL enzymes and reduced the severity of alternaria leaf spot in cabbage leaf.

Keywords: Rosemary. Cabbage. Resistance induction.

3 INTRODUÇÃO

A couve folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) é uma hortaliça de relevante importância social e econômica, pois suas características permitem a obtenção de elevado volume de produção em pequenas áreas, com rápida taxa de retorno de capital, além de seu valor nutricional. Porém, problemas fitossanitários veem se tornando cada vez mais uma ameaça ao sucesso agro econômico dessa atividade (VIDIGAL; PEREIRA, 2021).

A mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria brassicae* provoca redução severa na quantidade e na qualidade da produção, no valor econômico do produto e aumenta o custo de produção, uma vez que demanda produtos para o seu controle. Em áreas tropicais e subtropicais essa doença pode causar danos que variam de 6% até 100%, caso não sejam adotadas medidas adequadas de manejo (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

As práticas culturais na maioria das vezes não são suficientes para controlar esta doença que se caracteriza pela rápida disseminação do patógeno. Assim, o controle tem sido realizado pelo uso de fungicidas com os seguintes princípios ativos: mancozebe, tebuconazol e trifloxistrobina e extrato de folhas de *Melaleuca alternifolia* que estão registrados no sistema on-line Agrofit (MAPA, 2021). No entanto, o uso incorreto e indiscriminado de produtos químicos pode impactar negativamente a saúde humana e o meio ambiente e pode levar a um aumento do risco de desenvolvimento de populações de patógenos resistentes (KARIMI et al., 2016).

Em virtude dos inúmeros problemas advindo do mau uso dos agrotóxicos, torna-se indispensável investigar métodos alternativos para o controle de doenças de plantas que aliem eficiência, menor agressividade à saúde humana e ao equilíbrio de ecossistemas (ALVES; PERINA, 2014). Neste contexto está a indução de resistência em plantas, estimulada pelo tratamento com produtos de origem vegetal, como os extratos de plantas. Do ponto de vista fitossanitário, os produtos vegetais podem apresentar três atividades principais: antimicrobiana direta, estímulo de crescimento de plantas e indução de resistência (TAKESHITA et al., 2014). Esses mecanismos podem envolver enzimas como peroxidase, β -1, 3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase (STANGARLIN et al., 2011).

Dentre as várias espécies de plantas medicinais com ação fungicida e/ou indutora de resistência, algumas tem se destacado, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), que possui propriedades antibacteriana e antifúngica (AMARAL et al., 2021). As atividades biológicas desta planta têm sido relacionadas com os seus compostos secundários, tais como, carnosol, ácido carnósico, ácido rosmarínico, α -pineno, acetato de bornilo, cânfora e 1,8-cineol (BABOVIC et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013).

Trabalhos desenvolvidos com alecrim têm indicado seu potencial no controle de vários fungos, tanto por sua ação fungitóxica direta: *Fusarium verticillioides* (BOMFIM et al., 2015), *Phytophthora* sp. (LORENZETTI et al., 2017), *Bipolaris oryzae* (SILVA et al., 2017), *Fusarium graminearum* (NICOLODI-CAMERA et al., 2018), *Aspergillus flavus* (LEE et al., 2020), quanto pela indução de resistência: *Pseudocercospora vitis* em videira (MAIA et al., 2014), *Elsinoe ampelina* em videira (GARCIA et al., 2017), *Colletotrichum musae* em frutos de banana (LORENZETTI et al., 2019), *Colletotrichum nymphaeae* em morango (HOSSEINI et al., 2020) e entre outros. No entanto, não há nenhum relato do uso de produtos a base de alecrim para o controle de patógenos da couve.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial dos formulados químico e orgânico a base de *R. officinalis* no controle de *A. brassicae* e na indução de mecanismos de resistência em folhas de *B. oleracea*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação localizados na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon/PR (24° 33' 40" de latitude Sul e 54° 04' 12" de longitude Oeste), no período de março 2019 a dezembro 2020.

4.1 PATÓGENO E TRATAMENTOS

O isolamento foi realizado a partir de lesões em folhas de couve com sintomas característicos da mancha de alternaria causada por *Alternaria brassicae*, provenientes de plantio comercial no município de Marechal Cândido Rondon – PR, conforme metodologia proposto por Alfenas et al. (2016).

Fragmentos das folhas, na área de transição tecido sadio/doente foram cortados com diâmetro de 5 mm, imergidos em solução aquosa de etanol 70% por 30 seg, solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 1 min e enxaguadas em água destilada. Após à desinfestação superficial foram transferidos três fragmentos equidistantes por placa de Petri contendo ágar-água 2% esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 min e 1 atm. As placas foram mantidas em câmara de crescimento B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h durante 7 dias.

Após esse período, foram repicados para placa de Petri contendo o meio suco V8-ágar, conforme metodologia descrita por Zauza; Alfenas; Mafia (2016) (200 mL de suco V8, 20 g de ágar, 3 g de CaCO₃ e 1000 mL água destilada). As placas foram mantidas em B.O.D. por 7 dias

a 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h, e preservadas pelo método Castellani (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016).

Foram utilizados os seguintes tratamentos: formulado químico All Crim ConvencionalTM composto por fontes minerais de nitrogênio (1%), cobre (5%) e cálcio (29%), e formulado orgânico All Crim OrgânicoTM composto por fontes orgânicas de nitrogênio (1,87%), cálcio (0,37%), potássio (1,13%) e fósforo (0,36%), ambos com pó solúvel de alecrim. Os dois formulados foram utilizados nas concentrações 0% (apenas água destilada - testemunha); 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6% (massa/volume).

4.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As sementes de couve folha foram semeadas em bandejas de poliestireno expandida com 128 células contendo o substrato vermiculita expandida. Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 5 L preenchidos com mistura de solo, areia e matéria orgânica na proporção de 2:1:1 (v/v/v), autoclavados a 120 °C durante 1 h a 1 atm. A irrigação foi efetuada diretamente no solo duas vezes por dia.

Quinze dias após o transplante, as plantas foram aspergidas com os formulados químico e orgânico nas concentrações indicadas até o ponto de escorrimento. Três dias após os tratamentos, as plantas foram inoculadas com *A. brassicae* (1×10^4 conídios mL⁻¹) e mantidas em câmara úmida por 24 h (ALFENAS et al., 2016; ALFENAS; FERREITA; ALFENAS, 2016). Tanto os tratamentos quanto a inoculação foram efetuados ao final da tarde. Nos tratamentos e na suspensão fúngica foram adicionados espelhante adesivo (Tween 80) a 0,1%.

As avaliações de severidade da doença, iniciaram-se com o surgimento dos sintomas, quatro dias após a inoculação, totalizando seis avaliações. A severidade da doença foi estimada com escala diagramática (CONN; TEWAEI; AWASTHI, 1990). Com os dados obtidos foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da equação proposta por Shaner e Finney (1977),

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde:

Y_i e Y_{i+1} : severidade da doença na época de avaliação;

T_{i+1} e T_i : são os intervalos entre as avaliações;

n: número de observações.

Ao longo de 21 dias foi determinado o índice de clorofila nas folhas de couve usando clorofilômetro *Soil Plant Analysis Development* (SPAD-502). A primeira medição foi realizada antes da aplicação dos tratamentos e as demais no intervalo de três dias até o término do experimento.

Após o término do experimento, 35 dias após o transplante, foram realizadas avaliações das variáveis: massas fresca e seca da parte aérea; volume de raiz (em proveta graduada contendo volume conhecido de água); e área foliar (*Area Meter* - modelo LICOR LI-3000).

4.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As mudas de couve foram produzidas conforme indicado no item 4.2. Após sete dias foram transplantadas para copos de poliestireno expandido de 500 mL contendo substrato e húmus (proporção de 2:1), dispostos em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (luz led branca 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Sete dias após o transplante iniciou-se a coleta de duas folhas por planta (3ª folha tratada e inoculada e a 4ª folha acima não tratada e inoculada) nos tempos 0 (zero) (dia do tratamento), 1; 2; 3 (dia da inoculação, conforme item 5.2), 6 e 9 dias após a inoculação. Como as amostras eram destrutivas, em cada dia da coleta eram retiradas 24 amostras totalizando 288 unidades amostrais para cada ensaio. Durante as coletas, cada amostra foi imediatamente acondicionada em papel alumínio, identificada e armazenada a -20 °C.

As amostras de folhas foram homogeneizadas com 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 1% de polivinilpirrolidona (PVP), em tubos FastPrep 2 mL contendo uma esfera de zircônia de 0,1 mm e tampa rosqueável, previamente autoclavada a 120 °C por 20 min e 1 atm. Os tubos preparados foram processados em homogeneizador de amostras (Modelo FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals), sob velocidade calibrada (7,0 m s^{-1}), em um ciclo de 40 segundos de duração.

O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 *g* durante 25 min a 4 °C (STANGARLIN; PASCHOLATI; FRANZENER, 2005). O sobrenadante de 1 mL foi transferido para microtubo acrescido de mais 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), sem PVP, e centrifugado novamente. O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi transferido para microtubos e armazenado a -20 °C, e posteriormente utilizado para determinação do conteúdo proteico total e atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

O teor de proteínas totais foi avaliado pelo método de Bradford (1976). A mistura consistiu de 50 µL do extrato enzimático, 750 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL do reagente de Bradford. Após o reagente ser adicionado sob agitação e as amostras serem incubadas por 5 min, realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 595 nm. Para cada amostra foram feitas três réplicas. Os valores de absorvância foram plotados em curva padrão de albumina de soro bovino (ASB).

A atividade da peroxidase foi determinada à 30 °C por método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da reação continha 100 µL do extrato enzimático e 900 µL do substrato para enzima (12,5 mL de guaiacol a 2% e 310 µL de peróxido de hidrogênio P.A. em 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)). A reação foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, por 2 min, com leituras em intervalos de 15 seg. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade das polifenoloxidase (PFO) foi determinada de acordo com Duangmal; Apenten (1999), pela mensuração da oxidação do catecol convertido em quinona. O substrato para enzima foi composto por 110,1 mg de catecol dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), formando uma solução de catecol 0,02 M. Para a reação, que ocorreu a 30 °C, foram misturados 900 µL do substrato com 100 µL do extrato enzimático. As leituras foram realizadas a cada 15 seg a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. Os resultados obtidos foram expressos em absorvância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha 50 µL do extrato enzimático, 450 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg de L-fenilalanina diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)), a qual foi incubada a 40 °C por 2 h. Após esse período, foram adicionados 60 µL de HCl 5 M para cessar a reação e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorvância da mistura contendo amostra e do controle (50 µL de extrato enzimático e 950 µL de tampão Tris-HCl 0,0025 M (pH 8,8)). A atividade enzimática foi expressa em µg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, utilizando curva padrão para o ácido cinâmico.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em blocos casualizados. Os experimentos possuíram seis tratamentos representados pelos formulados químico e orgânico a base de alecrim nas

concentrações 0%; 0,5%; 1%; 2%; 4% e 6%, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) a ($p \leq 0,05$) pelo teste F ($p \leq 0,05$). Os tratamentos foram comparados com a testemunha (água) pelo teste de Dunnet a ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada no software livre Genes (CRUZ, 2013). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Observou-se que os formulados químico e orgânico a base de alecrim apresentaram efeito quadrático em função das concentrações para área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) causada por *A. brassicae*. A partir das regressões pode-se verificar que os pontos de mínima intensidade de doença ocorreram nas concentrações 5,07% e 4,93% dos formulados químico e orgânico, com AACPD de 34,51 e 41 respectivamente (Figura 1).

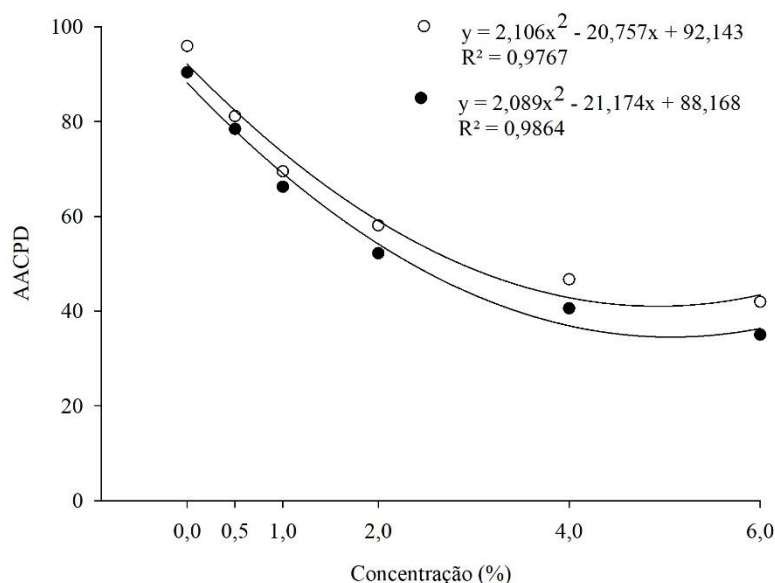


Figura 1 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) mancha de alternaria causada por *Alternaria brassicae* em couve folha (*Brassica oleracea*) tratada com fertilizantes foliares químico e orgânico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (●) Formulado químico CV= 22,20% e (○) formulado orgânico CV= 18,36%.

A pulverização dos formulados químico e orgânico a base de alecrim nas folhas de couve reduziram a severidade da mancha de alternaria em 61,29% e 56,30%, respectivamente, quando utilizados na concentração 6%. Corroborando com esses resultados, Assi et al. (2018), utilizando extrato aquoso de alecrim na concentração 130 mg L^{-1} , para controle de *A. solani* em

tomateiro, observaram redução média de 61,10% em relação à testemunha tratada somente com água.

Em outros patossistemas, Lorenzetti et al. (2019), utilizando formulado de alecrim em pó e líquido na concentração 2% e 6% respectivamente, observaram redução de 29% e 14,31% na área abaixo da curva de progresso da antracnose em frutos de banana. Em estudos realizados por Maia et al. (2014) com o objetivo de avaliar o potencial do óleo essencial de alecrim no controle da mancha-da-folha (*Pseudocercospora vitis*) e míldio (*P. viticola*) em videiras cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.), verificaram que as concentrações de 500 e 2000 μL^{-1} apresentaram decréscimo de aproximadamente de 57% e 49% na AACPD na primeira safra da cultura, e um decréscimo de 39% e 44% destas doenças na segunda safra da cultura.

Além do alecrim, os formulados utilizados possuem os nutrientes nitrogênio, cobre, cálcio, potássio e fósforo, os quais também podem estar relacionados com a resistência da planta a patógenos. De acordo com Marschner (2012), plantas bem nutridas possuem maior capacidade para sintetizar barreiras físicas e químicas de resistência, impedindo ou retardando a penetração e a colonização de tecidos foliares por patógenos.

A defesa das plantas tem relação direta com a disponibilidade e equilíbrio de nutrientes, como o efeito do nitrogênio na resistência de doenças, sendo totalmente dependente da dose, pois em doses adequadas contribui para a síntese de fenóis e alcaloides, mas em altas concentrações reduz a produção de compostos fenólicos (SEABRA JÚNIOR et al., 2013), muitos dos quais envolvidos na defesa vegetal.

O cobre é responsável pela produção de diversas enzimas envolvidas na síntese de proteínas, carboidratos, além de ser regulador ou fator essencial em vários sistemas enzimáticos de defesa das plantas a infecção. Além disso, tem funções antimicrobiana devido à formação de uma película na superfície das plantas que impede a fixação de estruturas propagativas dos patógenos, e indutora de resistência (COSTA et al., 2011), ativando processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, como exemplo, o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que por conseguinte destrói vários tipos de moléculas alterando o metabolismo da célula vegetal. Com o aumento do teor de peróxido de hidrogênio ocorre a explosão oxidativa que ativa os mecanismos de defesa da planta (DEBONA; RODRIGUES; DATNOFF, 2017).

O cálcio nos tecidos das plantas afeta a incidência de doenças de duas formas, na primeira, quando os níveis de cálcio são baixos, o fluxo de compostos de baixa massa molecular (açúcares) do citoplasma para o apoplasto é aumentado; na segunda, poligalacturonatos de cálcio são requeridos na lamela média para que haja estabilidade da parede celular (MARSCHNER, 2012). Muitos fungos invadem o tecido vegetal através da produção

extracelular de enzimas pectolíticas como poligalacturonase, que dissolve a lamela média. A atividade desta enzima é inibida pelo cálcio (YAMADA, 2004).

Em casos de doenças com lesões, ocorre maior concentração de cálcio em áreas com sintomas de necrose (BELAN et al., 2015). O cálcio é deslocado para áreas de tecido necrosado como uma das formas de defesa da planta, principalmente quando ocorre rompimento de membranas, pois é essencial na formação de barreiras estruturais e/ou químicas (WHITE; BROADLEY, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013), manutenção da integridade da membrana plasmática e seletividade do transporte de íons que elas realizam, além de regular processos celulares e reduzir a ligação eletrolítica induzida pelo patógeno (EPSTEIN; BLOOM, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Pinheiro et al. (2011), estudando o efeito das combinações de potássio e cálcio sobre a ferrugem asiática da soja, observaram que o cálcio reduziu a severidade da doença em todas as combinações com o potássio, podendo essa redução ultrapassar 86%, no entanto, o potássio reduziu a severidade apenas quando o suprimento de cálcio foi adequado. O potássio está envolvido em muitos processos celulares que influenciam na severidade das doenças. Este elemento, em combinação com o fósforo, induz maior espessura de cutícula e de parede celular, as quais funcionam como barreiras mecânicas à infecção pelos patógenos.

O potássio pode ainda equilibrar a assimilação de nitrogênio e tornar os tecidos mais fibrosos, aumentando a resistência a fungos e bactérias (SEABRA JÚNIOR et al., 2013). Além disso, o potássio localizado nas áreas ao redor do tecido necrosado pode estar envolvido em reações de defesa da planta (AMTMANN; TROUFFLARD; ARMENGAUD, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013), osmorregulação, síntese de carboidratos e proteínas, ativação de enzimas, transporte de outros nutrientes através de membranas e neutralização de ânions (EPSTEIN; BLOOM, 2006; MARSCHNER, 2012).

Quanto às variáveis vegetativas, não houve significância dos tratamentos, o que demonstra que os formulados químico e orgânico a base de alecrim não influenciaram nas massas fresca e seca da parte aérea, volume de raiz e área foliar das plantas de couve folha (Tabela 1). Comportamento semelhante ao presente trabalho foi verificado por Souza (2020), quando avaliou massa fresca de raiz, altura de plantas e número de vagens por planta de soja, tratadas com diferentes concentrações de fertilizante foliar a base de alecrim em parte aérea e inoculada com o nematoide *Pratylenchus brachyurus*, onde o produto não influenciou nas variáveis analisadas. Entretanto, o fertilizante incrementou a atividade da enzima peroxidase, com conseqüente redução das variáveis nematológicas, indicando que provavelmente não houve custo metabólico para a ativação dos mecanismos de defesa da soja.

Tabela 1 - Massas fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea, volume de raiz (VR) e área foliar da couve folha tratada com concentrações dos formulados químico e orgânico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e inoculada com *Alternaria brassicae*.

Concentração (%)	MFPA (g)		MSPA (g)		VR (mL)		Área foliar (cm ²)	
	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico	Químico	Orgânico
0,0	179,00 ^{ns}	187,00 ^{ns}	24,00 ^{ns}	20,00 ^{ns}	64,00 ^{ns}	56,00 ^{ns}	3046,00 ^{ns}	3114,00 ^{ns}
0,5	209,14	169,89	27,95	16,82	43,50	61,50	3560,48	2817,57
1,0	166,63	186,14	22,15	18,64	43,00	65,50	2836,70	2966,40
2,0	150,42	151,77	18,10	18,04	53,50	66,50	2560,86	2487,71
4,0	146,53	162,07	19,00	16,74	47,00	71,50	2494,53	2614,48
6,0	169,97	166,56	20,13	17,53	53,00	61,75	2893,57	2793,96
CV (%)	13,05	10,79	15,93	14,65	22,72	20,8	21,7	23,05

Médias não significativas pelo teste de variância a 5% de probabilidade. ^{ns} = não significativo. CV = coeficiente de variação.

Para o teor de clorofila nas plantas de couve folha tratadas com formulados químico e orgânico a base de alecrim também não houve significância (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de clorofila (unidade SPAD) em folha de couve em função do tratamento com concentrações dos formulados químico e orgânico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e inoculação com *Alternaria brassicae*.

Dias de avaliação		Concentração (%)						CV (%)
		0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	
1°	Químico ¹	67,18 ^{ns}	51,08 ^{ns}	56,23 ^{ns}	53,80 ^{ns}	62,20 ^{ns}	52,65 ^{ns}	15,60
	Orgânico ²	57,42 ^{ns}	57,85 ^{ns}	52,43 ^{ns}	52,93 ^{ns}	54,75 ^{ns}	52,83 ^{ns}	11,45
2°	Químico ¹	55,03 ^{ns}	50,85 ^{ns}	54,75 ^{ns}	50,53 ^{ns}	52,95 ^{ns}	53,03 ^{ns}	8,41
	Orgânico ²	66,45 ^{ns}	68,08 ^{ns}	54,43 ^{ns}	53,53 ^{ns}	62,63 ^{ns}	57,68 ^{ns}	15,36
3°	Químico ¹	52,23 ^{ns}	49,03 ^{ns}	54,88 ^{ns}	56,78 ^{ns}	52,38 ^{ns}	53,68 ^{ns}	6,41
	Orgânico ²	54,08 ^{ns}	54,38 ^{ns}	52,70 ^{ns}	57,43 ^{ns}	57,43 ^{ns}	52,05 ^{ns}	11,86
4°	Químico ¹	52,18 ^{ns}	45,88 ^{ns}	54,25 ^{ns}	54,25 ^{ns}	50,65 ^{ns}	52,40 ^{ns}	7,95
	Orgânico ²	56,25 ^{ns}	54,20 ^{ns}	56,38 ^{ns}	53,85 ^{ns}	55,40 ^{ns}	50,53 ^{ns}	7,31
5°	Químico ¹	51,33 ^{ns}	48,25 ^{ns}	54,93 ^{ns}	52,18 ^{ns}	50,58 ^{ns}	52,45 ^{ns}	6,81
	Orgânico ²	59,16 ^{ns}	58,35 ^{ns}	60,25 ^{ns}	60,55 ^{ns}	61,48 ^{ns}	58,85 ^{ns}	10,52
6°	Químico ¹	53,20 ^{ns}	45,80 ^{ns}	54,03 ^{ns}	56,18 ^{ns}	51,70 ^{ns}	51,78 ^{ns}	6,82
	Orgânico ²	59,18 ^{ns}	55,90 ^{ns}	57,98 ^{ns}	57,20 ^{ns}	44,00 ^{ns}	55,25 ^{ns}	18,26
7°	Químico ¹	48,03 ^{ns}	46,03 ^{ns}	49,65 ^{ns}	49,65 ^{ns}	47,23 ^{ns}	50,18 ^{ns}	10,88
	Orgânico ²	62,15 ^{ns}	54,98 ^{ns}	57,33 ^{ns}	57,08 ^{ns}	55,40 ^{ns}	56,10 ^{ns}	8,30

¹ Formulado químico a base de *R. officinalis*; ² Formulado orgânico a base de *R. officinalis*.

Médias não significativas pelo teste de variância a 5% de probabilidade. ns = não significativo. CV = Coeficiente de variação.

A fotossíntese é constituinte do mecanismo primário das plantas, e é neste processo que ocorre a formação de assimilados e, conseqüentemente, o acúmulo de reservas nas plantas. Apesar das clorofilas serem imprescindíveis no metabolismo primário, também possuem extrema importância na indução de metabólitos do mecanismo secundário. Esta importância se

dá, pois, para que ocorra a indução de resistência é necessário que haja o acúmulo de reservas, já que ocorre um gasto energético para a planta quando esta necessita da ativação de suas defesas latentes (GAYLER et al., 2004).

5.2 BIOQUÍMICA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A atividade de peroxidase foi incrementada em função dos tratamentos com formulado químico a base de alecrim na folha tratada (efeito local) quando comparada a testemunha (Figura 2A). O incremento da atividade de peroxidase iniciou no 1º dia após os tratamentos nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6%, permanecendo até o 2º dia nas concentrações 2%, 4% e 6%. Assim, o formulado pode promover um efeito de pré-condicionamento (iniciação) para a defesa contra o desafio do patógeno. Posteriormente, nos tempos 3º e 6º dias todos os tratamentos não diferiram entre si.

Para as concentrações 1%, 2%, 4% e 6% nas folhas tratadas e inoculadas verificou-se dois picos de indução, ou seja, no 1º dia após o tratamento, com incremento acentuado da atividade de peroxidase ficando em média 61,31% maior que relação a testemunha. O segundo, ocorreu no 9º dia após o tratamento. Dessa forma, o primeiro pico pode estar relacionado com efeito indutor do tratamento, uma vez que, não havendo a inoculação, a atividade tendeu a voltar a concentração basal. Entretanto, após a inoculação no tempo 3º dia após o tratamento e considerando o período para o fungo iniciar o processo infeccioso na planta, verificou-se a ocorrência do segundo pico da atividade de peroxidase.

Este segundo pico de atividade pode estar relacionado ao processo infeccioso, mas principalmente a indução de resistência, já que a atividade foi verificada nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6%. A concentração 0,5% teve um comportamento parecido com a testemunha, o que pode ter ocorrido devido à baixa concentração, conseqüentemente, não suficiente para elevar a atividade de peroxidase.

Verificou-se incremento de atividade da peroxidase na folha não tratada com formulado químico a base de alecrim, indicando um provável efeito indutor sistêmico. Esse efeito foi observado no 1º dia após os tratamentos na concentração 6% e no 2º dia nas concentrações 2% e 4% nas folhas não tratadas (Figura 2B). Para estas concentrações verificou-se dois picos de indução 1º, 2º e no 9º dias após o tratamento. O segundo pico, que ocorreu no 9º dia após o tratamento nas concentrações 2%, 4% e 6% incrementaram acentuadamente a atividade de peroxidase, ficando em média 69,38% maior em relação a testemunha. Já as concentrações 0,5% e 1% não apresentaram efeito significativo quando comparado a testemunha.

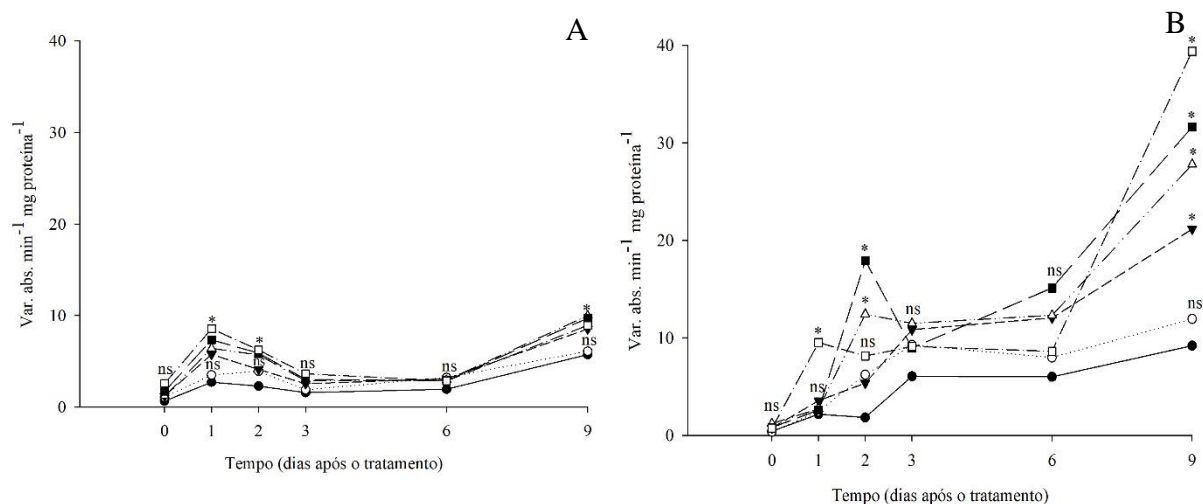


Figura 2 - Atividade de peroxidase em folhas de couve tratadas com formulado químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (·····○·····), 1% (---▼---), 2% (---△---), 4% (—■—) e 6% (---□---) e inoculadas com *Alternaria brassicae*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

O formulado orgânico a base de alecrim incrementou a atividade de peroxidase na folha tratada (Figura 3A). Na concentração 6% verificou-se os incrementos nos 1°, 2°, 3°, 6° e 9° dias após o tratamento, com os respectivos percentuais de 77,02%, 65,51%, 55,19%, 64,07% e 78,05%. Para as concentrações 2% e 4% do formulado orgânico a base de alecrim, houve diferença significativa no 6° dia após o tratamento. Este incremento pode estar relacionado ao processo infeccioso diferentemente da concentração 6%, no qual, o incremento deste, pode estar relacionado com efeito indutor do tratamento.

No formulado orgânico a base de alecrim verificou-se também incremento na atividade de peroxidase na folha não tratada, indicando um provável efeito indutor sistêmico. A concentração 6% incrementou a atividade de peroxidase no 1° dia após o tratamento, porém, nos 2°, 3° e 6° dias não houve diferença nos demais tratamentos (Figura 3B). Entretanto, no 9° dia após o tratamento, houve um incremento que ficou em média 58,46% maior quando comparado a testemunha. Portanto, a concentração 6% do formulado apresentou dois picos de indução na folha de couve não tratada e inoculada. O pico inicial pode caracterizar um *priming* seguido de um pico mais elevado que se manifesta após o início do processo infeccioso. Segundo Pascholati e Dalio (2018), a planta pode permanecer em estado de alerta “*priming*” e os mecanismos de resistência são ativados mais rapidamente na presença do patógeno.

Para as concentrações 2% e 4% do formulado orgânico houve diferença significativa no 6° e 9° dia após o tratamento, respectivamente, podendo estar relacionado à colonização do patógeno, visto que não foi observado um evento inicial de *priming*. As demais concentrações

0,5% e 1% não induziram a resistência da planta a ponto de elevar a atividade da enzima peroxidase após a inoculação.

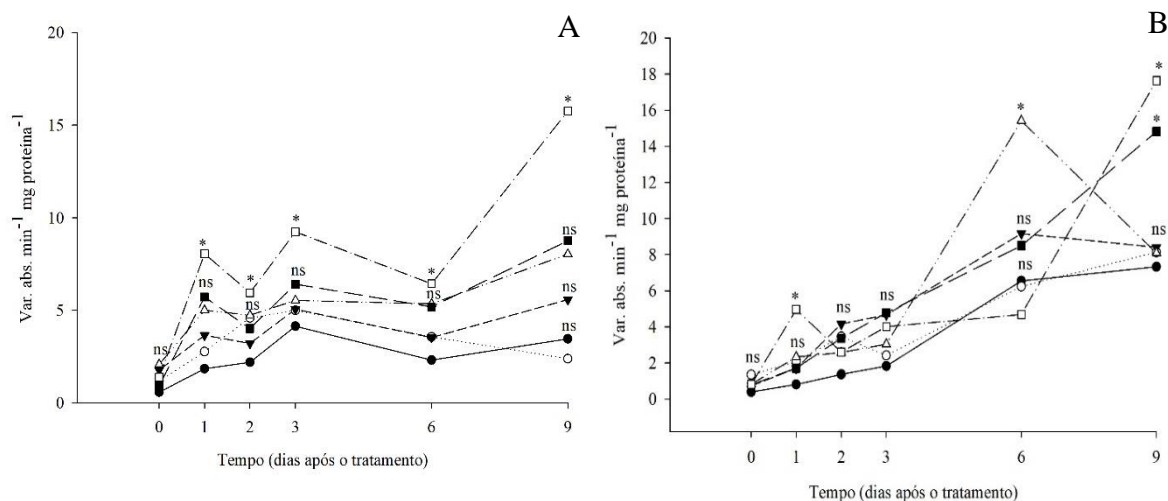


Figura 3 - Atividade de peroxidase em folhas de couve tratadas com formulado orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (……○……), 1% (---▼---), 2% (—△—), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculado com *Alternaria brassicae*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

Corroborando com os resultados, Lorenzetti et al. (2018), utilizando extrato bruto de *R. officinalis* nas concentrações 1%, 2,5% e 5% na região do colo da planta de soja e no solo, desafiada com *Macrophomina phaseolina*, observaram que a concentração 2,5% e 5% do extrato proporcionaram dois picos de indução da enzima peroxidase, sendo o primeiro no tempo 36 horas e o segundo no tempo 168 horas, tanto nas amostras do colo como na raiz da planta.

Considerando-se os resultados entre os formulados químico e o orgânico a base de alecrim, percebe-se que os nutrientes presentes nas formulações podem ter influenciado na indução da enzima peroxidase, visto que atuam nos processos fisiológicos e bioquímicos da planta. Dessa forma, a atividade de peroxidase no formulado químico foi mais expressiva nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6% nas folhas tratadas e inoculadas, enquanto que no formulado orgânico está foi induzida apenas na maior concentração (6%). Estes resultados podem ser explicados em função do micronutriente cobre estar presente na composição do formulado químico. O cobre contribui em rotas metabólicas de produção de compostos de resistência contra patógenos, principalmente na síntese de lignina (TAIZ; ZEIGER, 2017). A função deste micronutriente está envolvida no aumento da síntese de peróxido, quinonas e na formação de compostos fenólicos pelas plantas, atuando como defesa natural impedindo a penetração de

organismos nos tecidos vegetais, conseqüentemente, aumentando a resistência a infecção foliar (KUMAR et al., 2017).

O potássio e o fósforo presentes no formulado orgânico a base de alecrim podem ter influenciado na indução da atividade da enzima peroxidase. Romero et al. (2020), avaliando o efeito do fosfito de potássio Nutriphite Magnum® a 2,5 mL L⁻¹ (N 2%; P₂O₅ 40%; K₂O 16%) na indução de resistência da roseira contra *Peronospora sparsa*, observaram que o produto aumentou em 18,6% a atividade de peroxidase em relação a testemunha. Costa et al. (2017) utilizando fosfito de potássio na concentração 5 mL L⁻¹ contra *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijão observaram aumento da atividade de enzimas como peroxidase, superóxido dismutase, β-1,3 glucanase e quitinase, além de aumento nos níveis de lignina.

Entretanto, é importante resultar que tanto o formulado químico quanto o orgânico proporcionaram proteção induzida local e sistemicamente a ponto de elevar a atividade da enzima peroxidase nas folhas de couve. Essa indução está relacionada ao reconhecimento do elemento pelas moléculas receptoras ancoradas na membrana plasmática presentes nas células vegetais (RESENDE et al., 2009; DUBERY; SANABRIA; HUANG, 2012). Esse reconhecimento desencadeia o processo inicial de defesa da planta, a explosão oxidativa, que se refere ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que por sua vez atua como importante substrato das peroxidases e, por conseguinte, dispara o processo de lignificação da parede celular, com formação de precursores de polímeros de lignina, via atividade da peroxidase (WOJTASZEK, 1997; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

As plantas, após a exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, como também em locais distante dele (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Esse efeito foi verificado na folha não tratada com os formulados químico e orgânico a base de alecrim, que incrementaram a atividade da enzima peroxidase não somente de maneira local, mas também sistemicamente nas folhas protegendo contra o fungo *A. brassicae*.

A indução sistêmica da atividade de peroxidase nas folhas não tratadas que ocorrem na concentração mais elevada dos formulados químico e orgânico a base de alecrim pode indicar que a mesma possui maior concentração de substâncias eliciadoras, o que possibilita o reconhecimento e a sinalização de respostas de defesas mais eficientes nas plantas tratadas, promovendo a ativação de genes relacionados com a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, enzimas integrantes de rotas de produção de fitoalexinas e de mecanismos de defesa estruturais como a lignificação (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Siqueira et al. (2019) constataram que atividade elevada de peroxidase pode indicar aumento na biossíntese de lignina, que atua como uma barreira à infecção microbiana, e também pode promover aumentos na concentração de produtos de oxidação de fenólicos. Após a cutícula, as paredes celulares das plantas são as primeiras linhas de defesa contra invasão de fitopatógenos e as peroxidases são enzimas-chave no processo de sua construção (UPADHYAY et al., 2014). Esse envolvimento na lignificação da parede celular vegetal por peroxidases acionadas por moléculas eliciadoras tem correlação direta, com a resistência do hospedeiro, impedindo a entrada ou reduzindo a colonização pelo patógeno (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Quanto à atividade da enzima polifenoloxidase não houve diferença significativa nas concentrações testadas dos formulados químico e orgânico a base de alecrim nas folhas de couve tratadas e não tratadas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Souza (2020), que também não constatou indução dessa enzima em soja tratada com fertilizante foliar a base de alecrim nas concentrações 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹, 4,5 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹ e desafiada com *P. brachyurus*.

Em relação a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) na folha de couve tratada com formulado químico a base de alecrim, as concentrações 1%, 2%, 4% e 6% incrementaram a atividade enzimática no 1º dia após o tratamento, permanecendo essa atividade até o 2º dia nas concentrações 2%, 4% e 6% (Figura 4A). Posteriormente, nos tempos 3º e 6º dias após o tratamento todos retornaram aos níveis basais não diferindo estatisticamente entre si.

Desta forma, verificou-se que as concentrações 1%, 2%, 4% e 6% do formulado apresentou dois picos de indução. O primeiro pico pode estar relacionado com o efeito indutor do formulado, uma vez que ocorreu no 1º dia após o tratamento, e não havendo ainda a presença do patógeno, tendeu a voltar ao nível basal. Entretanto, após a inoculação de *A. brassicae* (que ocorreu no tempo 3º dia após o tratamento), verificou-se no 9º dia a ocorrência do segundo pico de atividade de FAL, com incremento que ficou em média 63,14% maior em relação a testemunha. Portanto, este segundo pico pode estar relacionado à colonização do patógeno, mas também, ao processo de indução de resistência, estimulado pelo formulado químico a base de alecrim nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6%. A concentração 0,5% não incrementou a atividade de FAL nas folhas tratadas.

Estes resultados demonstram que o formulado químico a base de alecrim para a atividade de FAL apresentou comportamento *priming*, visto que ocorreram dois picos de indução, sendo o segundo pico mais expressivo que o primeiro. Segundo Pascholati e Dalio (2018) o estado de *priming* começa por um estímulo e dura até o momento em que a planta é

exposta ao desafio por um estresse. Nessa fase os níveis de vários metabólitos primários e secundários, enzimas, entre outras moléculas são levemente alterados, colocando a planta em estado de alerta. No entanto, em resposta ao desafio com um patógeno, a planta entra na fase de *priming* pós desafio, momento em que as reações, como as enzimas, para combater o patógeno são induzidas rapidamente.

A atividade de FAL na folha de couve não tratada e inoculada apresentou-se semelhante à folha tratada com formulado químico a base de alecrim, exceto na ocorrência do segundo pico, demonstrando que o produto induz proteção sistêmica. Dessa forma, verificou-se dois picos de indução na atividade de FAL de forma sistêmica, em todas as concentrações testadas. O primeiro pico ocorreu no 1º dia após o tratamento, com incremento que ficou em média 65,94%, sendo este efeito relacionado ao indutor, pois não ocorrendo a inoculação verificou-se que a atividade tendeu a retornar ao nível basal nos 2º e 3º dias, no qual, todos os tratamentos não diferiram entre si.

Entretanto, após a inoculação de *A. brassicae* (que ocorreu no 3º dia após o tratamento), verificou-se no 6º dia o segundo pico de atividade de FAL, com incremento que ficou em média 71,57% maior que a testemunha, ou seja, este aconteceu mais cedo quando comparado a folha tratada (Figura 4B). Provavelmente, a antecipação da indução ocorrido nas folhas não tratadas tenha relação com o efeito protetor sistêmico do formulado.

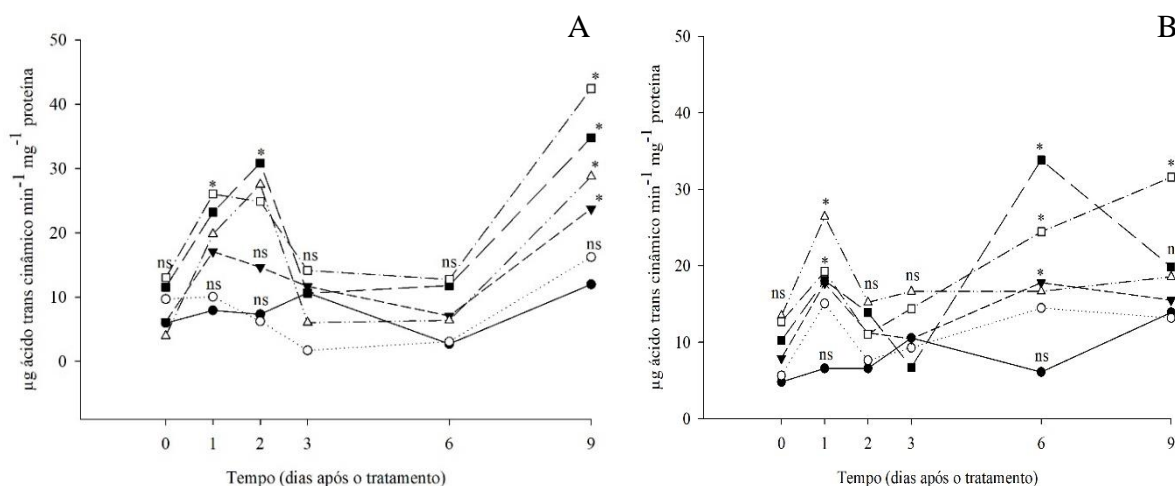


Figura 4 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de couve tratadas com formulado químico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (.....○.....), 1% (---▼---), 2% (—△—), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculadas com *Alternaria brassicae*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três dias após os tratamentos. ns: não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

A atividade de FAL foi incrementada em função dos tratamentos com formulado orgânico a base de alecrim na folha tratada quando comparada a testemunha (Figura 5A). As concentrações 2%, 4% e 6% do formulado orgânico incrementaram a atividade de FAL, sendo que as concentrações 4% e 6% induziram atividade nos 1° e 2° dias após o tratamento, enquanto a concentração 2% teve seu primeiro pico no 2° dia após o tratamento. Essas concentrações 2%, 4% e 6% proporcionaram incremento acentuado da atividade de FAL no 2° dia após o tratamento, ficando em média 70,64% maior que a testemunha.

Esses picos de atividade de FAL que ocorreram no 1° e 2° dias após o tratamento podem estar relacionados com o próprio efeito indutor do formulado, visto que, no 3° dia todos tratamentos não diferiram entre si. Entretanto, após a ocorrência da inoculação de *A. brassicae* no 3° dia após o tratamento, e considerando os dias para o fungo iniciar os processos de infecção e colonização, verificou-se no 6° e 9° dias a ocorrência de mais dois picos de atividade de FAL. Assim, os incrementos que ocorreram nos 6° e 9° dias após o tratamento, podem estar relacionados não somente ao processo infeccioso, mas também ao processo de indução de resistência, já que a atividade foi verificada nas concentrações 2%, 4% e 6% do formulado orgânico.

Verificou-se também atividade da enzima FAL na folha não tratada com formulado orgânico a base de alecrim e inoculada com *A. brassicae*, indicando um provável efeito indutor sistêmico. Esse efeito indutor foi observado no 1° dia após o tratamento em todas as concentrações (0,5; 1; 2; 4 e 6%) testadas, sendo que as concentrações 4% e 6% incrementaram a atividade até o 2° dia (Figura 5B). As concentrações incrementaram acentuadamente a atividade de FAL nos 1° e 2° dias, ficando em média 54,40% e 51,98%, respectivamente, maior em relação a testemunha. Esse resultado pode ser relacionado à indução sistêmica induzida pelo formulado orgânico a base de alecrim, visto que nos 3° e 6° dias após o tratamento, a concentração tendeu a voltar ao nível basal, não havendo diferença estatísticas entre os tratamentos.

No entanto, no 9° dia, quando o fungo já havia sido inoculado, verificou-se o segundo pico de atividade, podendo este estar relacionado não somente ao processo infeccioso, mas principalmente ao processo de indução da resistência, já que a atividade foi verificada nas concentrações 1%, 2%, 4% e 6%. O tratamento 0,5% demonstrou apenas um pico inicial no 1° dia, posteriormente teve um comportamento parecido com a testemunha, portanto, essa concentração não conseguiu elevar a atividade da enzima FAL após a inoculação de *A. brassicae* na folha de couve.

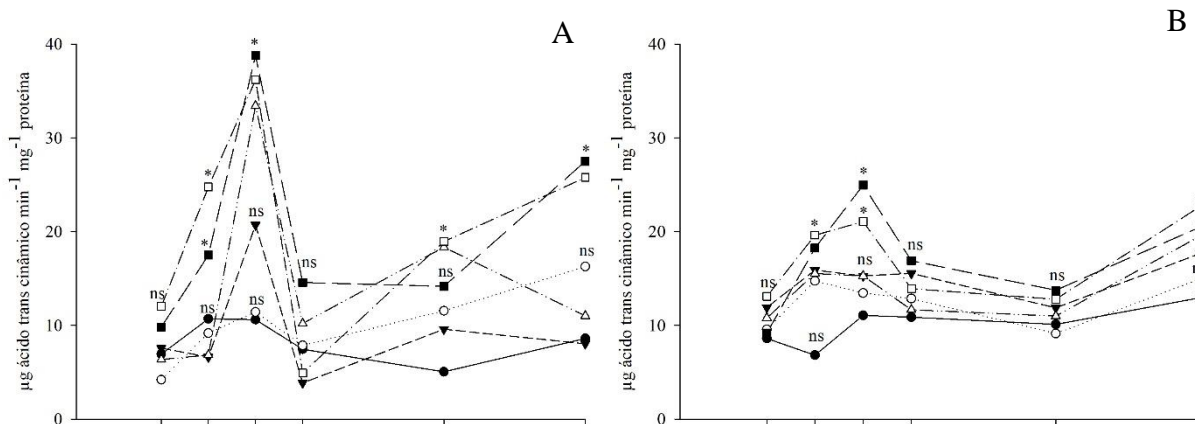


Figura 5 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de couve tratadas com formulado orgânico a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em concentrações de 0 (—●—), 0,5% (·····○·····), 1% (---▼---), 2% (---△---), 4% (—■—) e 6% (—□—) e inoculado com *Alternaria brassicae*. O tratamento ocorreu no tempo zero e a inoculação no tempo três após os tratamentos. ns; não significativo; *: significativo em comparação com a testemunha (água) pelo teste Dunnett ($P \leq 0,05$). (A) representa a folha tratada e inoculada e (B) representa a folha acima não tratada e inoculada.

Resultados opostos foram encontrados por Lorenzetti et al. (2018), que em pesquisa utilizando extrato de alecrim em soja inoculada com *Macrophomina phaseolina* observaram que tanto em amostras de colo quanto em amostras de raiz não houve um pico de indução inicial, sendo este observado apenas após a inoculação do patógeno. Nesta pesquisa, tanto o formulado químico quanto o orgânico induziram incrementos acentuados da atividade de FAL nas folhas tratadas e não tratadas, tanto no 1º dia após o tratamento quanto após a inoculação do patógeno.

Para a planta é importante o reconhecimento precoce do patógeno, para que a mesma possa mobilizar a tempo as defesas bioquímicas e/ou estruturais disponíveis para se proteger do patógeno. Neste sentido, na indução de resistência, a enzima FAL é de grande importância, uma vez que é reguladora da síntese de compostos fenólicos, sendo estes precursores da lignina e ácido salicílico, que atuam na defesa estrutural e no processo de sinalização da resposta sistêmica respectivamente (BONAS; LAHAYE, 2002).

Dessa forma, o aumento da atividade da enzima FAL pode estar relacionado não apenas aos compostos secundários presentes no alecrim, mas também aos nutrientes da composição dos formulados químico e orgânico utilizados. Os nutrientes podem participar de rotas metabólicas de compostos capazes de inibir a infecção e a colonização de patógenos, rotas estas relacionadas com a indução de resistência (POZZA; POZZA, 2012).

O micronutriente cobre está envolvido na rota do ácido chiquímico, agindo como co-fator para a síntese de compostos que serão utilizados em outras rotas bioquímicas de defesa da planta (GRAHAM; WEBB, 1991). Um dos aminoácidos formados na via do ácido chiquímico é a fenilalanina, que será utilizado pela FAL na rota dos fenilpropanoides, dando origem a vários compostos de defesa de origem fenólica (PERES, 2004). Assim, houve maior expressão

da enzima FAL nas plantas tratadas com o formulado químico quando comparado à atividade da peroxidase.

O cálcio presente nos formulados químico e orgânico a base de alecrim pode ter auxiliado na indução da atividade da enzima FAL, tanto local quanto sistemicamente. O cálcio desempenha papel fundamental no reconhecimento de invasores patogênicos na membrana plasmática, sendo que em poucos segundos após a infecção pelo patógeno, há mudança no potencial da membrana e ocorre aumento de cálcio no citoplasma, atuando dessa forma, como mensageiro secundário (MARSCHNER, 2012).

O incremento da atividade de FAL nas folhas não tratadas com formulado orgânico a base de alecrim, no 1º dia após o tratamento (Figura 5B), pode estar relacionado a mobilidade do potássio, um dos componentes desse formulado, nos tecidos da planta. Nas plantas, o potássio pode influenciar na intensidade de doença em virtude da ativação de enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese, processos fornecedores de cadeias de carbono para a síntese de substâncias de defesa, bem como a regulação estomática, influenciando no transporte de solutos via fluxo de massa (ZAMBOLIM; VENTURA, ZANAO JÚNIOR, 2012). Além disso, atua como ativador de mais de 60 enzimas, com exemplo, as desidrogenases, cinases, oxidoredutases, transferases e sintetases (MARSCHNER, 2012). Por outro lado, o fósforo, outro componente do formulado orgânico, pode produzir mudanças bioquímicas como aumento de vitamina C, óleos vegetais, polifenóis, peroxidase e amônia, ou seja, um ambiente desfavorável ao patógeno (ZAMBOLIM, VENTURA, 1993). Silva et al. (2015) observaram que o fosfito de potássio reduziu a severidade da antracnose em 60,4%, e aumentou a atividade da enzima peroxidase e da FAL, indicando assim o efeito desses nutrientes no sistema de defesa vegetal.

Nesta pesquisa, verificou-se que os formulados químico e orgânico a base de alecrim atuaram de maneira semelhante na folha de couve tratada e não tratada, tanto para a atividade da enzima peroxidase quanto para FAL, pois as duas enzimas apresentaram comportamento *priming*. Assim, os tratamentos com os formulados induziram a atividade das enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas, sugerindo uma pré-ativação dessas enzimas antes da inoculação do patógeno, contribuindo para o aumento da resistência contra *A. brassicae*. Portanto, a expressão das enzimas pode estar fortemente correlacionada com a ocorrência da infecção do fungo e, também, pela presença de um agente eliciador nos formulados a base de alecrim.

Segundo Romeiro e Garcia (2009), quando plantas são previamente expostas a um determinado eliciador, seus tecidos reagem mais rapidamente e com mais eficiência às

tentativas de colonização do patógeno. O contato entre o eliciador e os tecidos da planta desencadeia a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos (THATCHER; ANDERSON; SINGH, 2005; BECKERS; SPOEL, 2006). Esses sinais se difundem por toda a planta, sistemicamente ou induzindo sua síntese em cadeia (ROMEIRO; GARCIA, 2009), como observado para peroxidase e FAL nas folhas de couve, onde há um primeiro pico de indução e, posteriormente, picos que compreendem maior atividade tanto por indução quanto pela colonização do patógeno, portanto, picos mais expressivos que os primeiros, contribuindo assim, para o controle da doença.

6 CONCLUSÃO

A concentração 6% dos formulados químico e orgânico a base de alecrim promoveu redução na severidade da mancha de alternaria em folhas de couve. Os formulados também foram capazes de induzir a atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, tanto local quanto sistemicamente em couve folha desafiada com *A. brassicae*, revelando a ação de eliciadores presentes nos formulados a base de alecrim, com efeito dose-dependente para a ativação desses mecanismos e, conseqüentemente, redução da severidade dos sintomas da mancha de alternaria.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 73–90, Dec./Feb. 2012.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; ALFENAS, R. F. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 5, p. 123-144.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G. GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 2, p. 55-92.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, R. F. Produção, determinação e calibração da concentração de inóculo em suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 4, p. 107-121.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Maringá: UEM/MPA, 2014. p. 73-86.
- AMARAL, S. M.; CARVALHO, L. Q. C.; PEREIRA, N. A. C. S.; SOBRINHO, M. F. S.; SOBRINHO, M. F. S.; SANTOS, L. D. L.; BARBOSA, M. C. N. A.; SILVA, B. L.;

RODRIFUES, A. E. F.; LINHARES, B. O.; CARVALHO, F. S.; CUNHA, A. P. G.; SOLANO, L. S.; SANTOS, D. O.; LOÉS, L. A. S. Alecrim (*Rosmarinus officinalis*): principais características. **Revista de Casos e Consultoria**, Natal, RN, v. 12, n. 1, e24651, abr./mai. 2021.

AMTMANN, A.; TROUFFLARD, S.; ARMENGAUD, P. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, n. 4, p. 682-691, Mar./Aug. 2008.

ASSI, L.; VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUNH, O. J.; MEINERZ, C. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de pinta preta e de mancha bacteriana em tomateiro por extrato formulado de *Rosmarinus officinalis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 44, n. 4, p. 355-360, 2018.

BABOVIC, N.; DJILAS, S.; JADRANIN, M.; VAJS, V.; IVANOVIC, J.; PETROVIC, S.; ZIZOVIC, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidante capacity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Holanda, v. 11, n. 1, p. 98-107, Aug./Jan. 2010.

BECKERS, G. J. M.; SPOEL, H. S. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, New York, v. 8, n. 1, p.1-10, Jul./Jan. 2006.

BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, M. L. O.; POZZA, A. A. A.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 105-111, Oct./Jan. 2015.

BOMFIM, N. S.; NAKASSUGI, L. P.; OLIVEIRA, J. F. P.; KOHIYAMA, C. Y.; MOSSINI, S. A. G.; GRESPLAN, R.; NERILO, S. B.; MALLMANN, C. A.; FILHO, B. A. A.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. **Food Chemistry**, Barking, v. 166, p. 330-336, Jun./Jan. 2015.

BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 1, p. 44-50, Nov./Feb. 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Sep./May. 1976.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. v. 13, cap. 4, p. 81-124.

CONN, K. L.; TEWARI, J. P.; AWASTHI, R. P. A. Disease assessment key for *Alternaria blackspot* in rapessed and mustard. **Canadian Plant Disease Survey**, Ottawa, v. 70, n. 1, p. 19-22, Nov./Feb. 1990.

COSTA, A. T.; AMARAL, M. F. Z.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M.; BARA, M. T. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 13, n. 2, p. 240-245, mai./abr. 2011.

- COSTA, B. H. G.; MONTEIRO, A. C. A.; BOTELHO, D. M. S.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. SILVA, B. M. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 166, n. 2, Mar./Sep. 2017.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v. 35, n. 3, p. 271-276, Jul./Sep. 2013.
- DEBONA, D.; RODRIGUES, F. A.; DATNOFF, L. E. Silicon's role in abiotic and biotic plant stresses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 55, n.1, p. 85-107, May./Aug. 2017.
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanun tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 3, p. 351-359, Feb./May. 1999.
- DUBERY, I. A.; SANABRIA, N. M.; HUANG, J. C. Nonself perception in plant innate immunity. In: LOPES-LARREA, C. **Self and no self**. New York: Landes Bioscience and Springer Science, 2012. p. 79-107.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 401 p.
- GARCIA, C.; HORST, M. V.; MAIA, A. J.; LEITE, C. D.; FARIA, C. M. D. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças da videira cultivar Cabernet Sauvignon. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, PE, v. 12, n. 4, 452-457, mar./jul. 2017.
- GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade-off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 3, p. 363-371, Apr./May. 2004.
- GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**, 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 3, p. 92-105.
- GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MONTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. **Micronutrients in Agriculture**. 2. ed. Madison: Soil Society of America, 1991. p. 329-370.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 73-82, Sep./Jan. 1982.
- HOSSEINI, S.; AMINI, J.; SABA, M. K.; KARIMI, K.; PERTOT, I. Preharvest and postharvest application of garlic and rosemary essential oils for controlling anthracnose and quality assessment of strawberry fruit during cold storage. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, p. 1-15, Apr./Aug. 2020.
- KUMAR, C. J. N.; RAJANGAM, J.; BALAKRISHNAN, K.; BORA, L. Influence of foliar fertilization of micronutrients on leaf micro nutrient status of mandarin orange (*Citrus reticulata* blanco) in lower polney hills. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, India, v. 6, n. 5, p. 516-522, Apr./May. 2017.

KARIMI, K.; AHARI, A. B.; WEISANY, W.; PERTOT, I.; VRHOVSEK, U.; ARZANLOU, M. Funneliformis mosseae root colonization affects *Anethum graveolens* essential oil composition and its efficacy against *Colletotrichum nymphaeae*. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 90, p. 126-134, Feb./Jun. 2016.

LEE, L. T.; GARCIA, S. A.; MARTINAZO, A. P.; TEODORO, C. E. de S. Fungitoxidade e composição química do óleo essencial (*Rosmarinus officinalis*) sobre o *Aspergillus flavus*. **Research, Society and Development**, Itajubá, MG, v. 9, n. 8, p. e202985628, jun./jun. 2020.

LORENZETTI, E.; NETO, A. J. A.; SILVA, I. F.; STANGARLIN, J. R. Ação do extrato de alecrim contra *Phytophthora* sp. e *Fusarium solani*. **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, PR, v. 10, n. 1, p. 50-57, jan./mar. 2017.

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

LORENZETTI, E.; SOUZA, D. H. G.; TARTARO, J.; STANGARLIN, J. R.; BRAGA, G. C. Formulado de alecrim no controle de antracnose e conservação em pós-colheita de banana nanica. **Multi-Science Journal**, Urutaí, GO, v. 2, n. 2, p. 16-19, jun./ago. 2019.

MAIA, A. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. R.; FARIA, C. M. D. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; JARDINETTI, V. A.; BATISTA, B. N. Óleos essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, v. 49, n. 5, p. 330-339, fev./abr. 2014.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London: Academic Press, 2012. 651 p.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários** - AGROFIT. 2021. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 28 set. 2021.

NICOLODI-CAMERA, J.; KOEFENDER, J.; FERREIRA-FERNANDES, A. M.; WAGNER-SODER, E. M. Atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais no crescimento micelial de *Fusarium graminearum* Schwabe. **Multítemas**, Campo Grande, MS, v. 23, n. 54, p. 141-152, mai./ago. 2018.

PASCHOLATI, S. F. P.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. v. 1, p. 424-452.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PINHEIRO, J. B.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; MOREIRA, A. S.; ALVES, M. C. Severidade da ferrugem da soja em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 1, p. 43-50, jan./fev. 2011.

POZZA, E.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: MACHADO, A. K. F. M.; OGOSHI, C.; PERINA, F. J.; SILVA, G. M.; NEENTO, H. S.; COSTA, L. S. A. S.; ALENCAR, N. E.; MARTINS, S. J.; TERRA, W. C.; ZANCAN, W. L. A. **Avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. 1. ed. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, 2012. p. 259-281.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para ativação de receptores de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, Brasília, DF, v. 15, n.1, p.129-198, jul./dez. 2009.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 2, p.123-130, mar./abr. 2003.

ROMEIRO, R. D. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 85-99.

ROMERO, P. I. A.; FERREIRA, A. F. T. A. F.; VELASCO, R. G.; HERRERA, M. E. M.; SICLÁN, M. L. S.; COBA, C. F. C. Efeito dos fosfito de potássio, silício e quitosana da resistência da roseira à infecção por *Peronospora sparsa*. **Revista Agrária Acadêmica**, Imperatriz, MA, v. 3, n. 3, p. 128-138, mai./jun. 2020.

SEABRA JUNIOR, S.; LALLA, J. G.; GOTO, R.; MARINGONI, A. C.; VILLAS BOAS, R. L.; ROUWS, J. R. C.; ORIANI, E. E. Suscetibilidade à podridão negra e produtividade de brócolis em função de doses de nitrogênio e potássio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 426-431, jul./set. 2013.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 1051-1056, Dec./Feb. 1977.

SILVA, J. L.; SOUZA, P. E.; ALVES, E.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FREITAS, M. L. O.; ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, M. L. V. (2015). Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 9, n. 8, p. 243–253, Dec./Feb. 2015.

SILVA, W. R.; MOREIRA-NUÑEZ, V.; GAVIRIA-HERNANDÉZ, V.; GONÇALVES, V. P.; AZAMBUJA, R. H. M.; FARIAS, C. R. J. Fungitoxicidade de extratos vegetais e óleo essencial de alecrim no crescimento micelial e esporulação de *Bipolaris oryzae*. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 29, n. ¾, p. 257-265, abr./ago. 2017.

SIQUEIRA, I. T. D.; CRUZ, L. R.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A. Indução de resistência por acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 45, n. 1, p. 76-82, jan./fev. 2019.

SOUZA, D. H. G. Indução de resistência em soja e controle de *Pratylenchus brachyurus* com fertilizante foliar a base de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). 2020. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2020.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; FRANZENER, G. Phenols, β -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turcicum* in maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 31, n. 3, p. 261-267, Apr./Oct. 2005.

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 Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, PR, v. 10, n. 1, p. 18-46, set./dez. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TAKESHITA, V.; OLIVEIRA, F. F.; WITT, F. A. P.; RIBEIRO, F. C. Efeito inibitório de extratos vegetais da família Alliioideae sobre *Guignardia citricarpa* – agente causal da mancha preta em *citrus*. **Enciclopédia Biosfera**, Jandaia, GO v. 10, n. 10, p. 907-919, set./dez. 2014.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of comercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 43, n. 1, p. 587-595, Jul./May. 2013.

THATCHER, L. F.; ANDERSON, J. P.; SINGH, K. B. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, n. 1, p. 1-19, Dec./Feb. 2005.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 1, p. 21-34, jan./jun. 2015.

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

UPADHYAY, P.; RAI, A.; KUMAR, R.; SINGH, M.; SINHA, B. Differential expression of pathogenesis related protein genes in tomato during inoculation with *A. sonali*. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, Bruxelas, v. 5, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2014.

VIDIGAL, S. M.; PEREIRA, P. R. G. Cultivo de brássicas. In: FONTES, P. R. R.; NICK, C. **Olericultura: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, DAA, 2021. p. 467-485.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, London v. 92, n. 4, p. 487-511, Jun./Oct. 2003.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, London, v. 322, n. 3, p. 681-692, Dec./Mar. 1997.

YAMADA, T. Resistência de plantas às pragas e doenças: pode ser afetada pelo manejo da cultura? **Informações Agronômicas**, Piracicaba, SP, n. 108, p. 1-7, out./dez. 2004.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A Resistencia a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, 1993. v. 1, p. 275-318.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; ZANAO JÚNIOR, L. A. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. 1. ed. Viçosa: Editora Independente, 2012. 322 p.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016. cap. 1, p. 27-54.