

UNIOESTE  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA

**BRUNA CAROLINE SCHONS**

**MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL E CONTROLE DE *MELOIDOGYNE*  
*INCOGNITA* POR FORMULADO ALECRIM EM HIDROGEL EM TOMATEIRO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON-PR

2020

BRUNA CAROLINE SCHONS

**MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL E CONTROLE DE *MELOIDOGYNE*  
*INCOGNITA* POR FORMULADO ALECRIM EM HIDROGEL EM TOMATEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Oeste Paraná, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Claudio Yuji Tsutsumi

Co orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Linha de pesquisa: Fitossanidade e controle alternativo

MARECHAL CÂNDIDO RONDON-PR

2020

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

Schons, Bruna Caroline  
Mecanismos de defesa vegetal e controle de Meloidogyne incognita por formulado alecrim em hidrogel em tomateiro / Bruna Caroline Schons; orientador Claudio Yuji Tsutsumi; coorientador José Renato Stangarlin. -- Marechal Cândido Rondon, 2020.  
52 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Fitopatologia. 2. Nematologia. 3. Controle alternativo. I. Tsutsumi, Claudio Yuji, orient. II. Stangarlin, José Renato, coorient. III. Título.



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.



## BRUNA CAROLINE SCHONS

Mecanismos de defesa vegetal e controle de *Meloidogyne incognita* por formulado alecrim em hidrogel em tomateiro.

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

Orientador(a) - Claudio Yuji Tsutsumi

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

Odair José Kuhn

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

Roberto Luis Portz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Marechal Cândido Rondon, 2 de março de 2020

Quando os pais ensinam,  
incentivam e acompanham seu filho,  
orgulho de seus feitos terão.  
Aos meus pais, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o meu Senhor, pela benção, força, luz e coragem para enfrentar os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Eliane Benitez e Valdecir Schons, que além de me apoiarem, são o que tornam possível as realizações dos meus sonhos, são o colo nos dias difíceis, o incentivo diante das barreiras da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Tsutsumi, ao qual me acolheu e sempre esteve disposto a ajudar quando necessário.

Ao meu coorientador Prof Dr. José Renato Stagarlin, pelo incentivo, por acreditar em mim e por me apresentar a área da fitopatologia. Agradeço não apenas pelo conhecimento transmitido, mas também pelo o que me ensinou através de sua forma de ser e de ver a vida.

Ao Prof. Dr. Odair José Kuhn pelo apoio, conversas e ajuda durante esse trajeto. Deixo meu agradecimento também aos demais professores e funcionários da Unioeste, por fazerem desta universidade meu segundo lar.

Aos meus amigos de pós-graduação e de vida Roberto Cecatto Júnior, Juliana Fujimoto e Vanessa Faria, agradeço pelo incentivo, pela parceria, pela ajuda nesse trabalho e em tantos outros. E um agradecimento especial à Olivia Diulen Costa Brito, que me auxiliou em todas as etapas do mestrado e foi uma de minhas principais incentivadoras nos momentos difíceis, muito obrigada.

Um agradecimento especial a todos do Laboratório de Nematologia e do Laboratório de Fitopatologia da Unioeste, assim como aos membros do Cobalfi.

A todos os meus amigos, que, mesmo de outras áreas, ofereceram ajuda em todos os momentos que necessitei, além de apoio e amor. Um agradecimento especial a Shayda Muniz, Taynara Batista, Michelli Demarchi e Bruna Freitas, meu muito obrigada por tudo o que já fizeram por mim.

A Unioeste e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de cursar um programa de mestrado.

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior– CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma participaram da realização deste estudo.

Muito obrigada!

“Se você pode sonhar,  
você pode realizar”.

Walt Disney

## RESUMO

SCHONS, Bruna Caroline. **Mecanismos de defesa vegetal e controle de *Meloidogyne incognita* por formulado alecrim em hidrogel em tomateiro.**

Orientador: Prof. Dr. Claudio Yuji Tsutsumi.

Co-orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

O tomateiro é uma planta suscetível aos danos causados por diversas doenças, dentre elas destaca-se o *Meloidogyne incognita*, que causa perdas na produção e possui um difícil controle. Buscando formas eficazes para solucionar esse problema, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método alternativo através da utilização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em formulação com o hidrogel, como veículo de liberação. Para isso foi realizado experimento de motilidade e mortalidade *in vitro* nas concentrações 1%, 3%, 5% e 10% do extrato puro de alecrim, uma avaliação foi realizada após 24 horas de contato com os tratamentos (motilidade), foi realizada então a substituição dos tratamento por água e uma avaliação foi realizada as 48 horas (mortalidade). Para verificar a efetividade desse controle em situação semelhante a de campo, foi conduzido um experimento em casa de vegetação com tomates da variedade Santa Clara, com os tratamentos 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 g do formulado, onde a testemunha correspondeu a 1,25 g de hidrogel sem adição de extrato e uma testemunha absoluta contendo apenas com água. As variáveis analisadas foram: quantidade de massas de ovos (MO); quantidade total de galhas; número total de nematoides por raiz; número de nematoides por grama de raiz ( $N\ g^{-1}$  raiz); fator de Reprodução. Afim de verificar se o controle obtido pelo formulado foi proveniente de indução de resistência, foi realizado um novo experimento utilizando as doses testadas anteriormente, onde amostras de raízes foram recolhidas em triplicata nos tempos 0, 5, 10, 20 e 50 dias após a inoculação, sendo que a inoculação foi realizada 3 dias após o contato das plantas com o tratamento. Foram medidas a atividade das enzimas Fenilalanina amônia liase (FAL), Peroxidase (POX), Polifenoloxidase (PFO) através de espectrofotometria. O resultado do experimento *in vitro* mostrou imobilidade de 100% dos juvenis de *M.incognita* na dose calculada de 1,5% e 100% da mortalidade na dose calculada de 4,5%. Nas variáveis nematológicas foi observado um comportamento semelhante a todas, onde foi constatada a redução proporcional ao aumento da dose, mostrando que o controle foi efetivo. Nas enzimas, a FAL não mostrou diferença estatística em nenhum tratamento e em nenhum tempo testado. Já a POX e a PFO mostraram picos de diferentes tratamentos em diferentes momentos, sendo destaque o tratamento de 1,25 g do formulado, podendo ser um indício de indução de resistência.

Palavras-chave: Indução de resistência; Controle alternativo; *Rosmarinus officinalis*; *Solanum lycopersicum* L.



## ABSTRACT

SCHONS, Bruna Caroline. **Plant defense mechanisms and control of *Meloidogyne incognita* by formulated rosemary in hydrogel in tomato.**

Advisor: Prof. Dr. Claudio Yuji Tsutsumi.

Co-advisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Tomato is a susceptible plant to damage caused by various diseases, including *Meloidogyne incognita* that stands out causing losses in production and having a difficult control. Seeking for effective ways to solve this problem, the objective of this work was to develop an alternative method through the use of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) in formulation with the hydrogel, as a delivery vehicle. For this purpose, an *in vitro* motility and mortality experiment was carried out at concentrations of 1%, 3%, 5% and 10% of the pure rosemary extract. An evaluation was carried out after 24 hours of contact with the treatments (motility). Replacement of treatments with water and an evaluation was carried out at 48 hours (mortality). To verify the effectiveness of this control in a similar situation to the field, an experiment was carried out in a greenhouse with tomatoes of the Santa Clara variety, with treatments 0.25; 0.50; 0.75; 1.00 and 1.25 g of the formulated, where the control corresponded to 1.25 g of hydrogel without the addition of extract and an absolute control containing only water. The variables analyzed were: quantity of egg masses (EM); total number of galls; total number of nematodes per root; number of nematodes per gram of root (N g<sup>-1</sup> root); reproduction Factor. To verify if the control obtained by the formulated was from resistance induction, a new experiment was carried out using the doses tested previously, where root samples were collected in triplicate at times 0, 5, 10, 20 and 50 days after inoculation, and the inoculation was performed 3 days after the contact of the plants with the treatment. The activity of the enzymes Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Peroxidase (POX), Polyphenoloxidase (PFO) was measured by direct spectrophotometry. The result of *in vitro* experiment show the immobility of 100% of juveniles of *M.incognita* was found at the calculated dose of 1.5% and 100% of mortality at the calculated dose of 4.5%. All nematological variables show the same behavior, where it was found the proportional reduction to the dose increase, showing that the control was effective. In enzymes, PAL showed no statistical difference in any treatment and in any time tested. POX and PFO, on the other hand, showed peaks of different treatments at different times, highlighting the treatment of 1.25 g of the formulated product, which may be an indication of resistance induction.

Key-words: Resistance induction; Alternative control; *Rosmarinus officinalis*; *Solanum lycopersicum* L.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Porcentagem de *Meloidogyne incognita* imóveis após 24 horas (a) e mortos após 48 horas (b) de contato direto com o formulado de alecrim em hidrogel nas concentrações 0 (testemunha, correspondente a água destilada), 1%, 3%, 5% e 10%. \*\*Significativo a 1% de probabilidade e \*significativo a 5% de probabilidade de acordo com teste de regressão do tipo Plateu.....**19**

**Figura 2** - Efeito das doses do formulado alecrim em hidrogel ( $\text{g cova}^{-1}$ ) nas variáveis nematológicas quantidade de massas de ovos (a), quantidade total de galhas (b), número total de nematoides por raiz (c), número de nematoides por grama de raiz (d) e fator de reprodução (e) em tomateiro inoculado com *M. incognita*, Análise de regressão a 5% de probabilidade.....**23**

**Figura 3** - Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses ( $\text{g cova}^{-1}$ ) do formulado hidrogel em alecrim ocorreu três dias antes da inoculação. Não houve diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação.....**26**

**Figura 4** - Atividade da enzima peroxidase em em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses ( $\text{g cova}^{-1}$ ) do formulado hidrogel em alecrim ocorreu três dias antes da inoculação. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.....**27**

**Figura 5** – Atividade da enzima polifenoloxidase em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses ( $\text{g cova}^{-1}$ ) do formulado hidrogel em alecrim ocorreu três antes da inoculação. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.....**29**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Efeito do formulado alecrim em hidrogel em comparação as testemunhas nas variáveis nematológicas quantidade de massas de ovos (MO), quantidade total de galhas, número total de nematoides por raiz, número de nematoides por grama de raiz ( $N\ g^{-1}$ raiz) e fator de reprodução (FR) em plantas de tomateiro inoculadas com <i>M. incognita</i> .....	<b>21</b>
---	-----------

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFIA</b> .....	15
2.1 A cultura do tomateiro .....	15
2.3 Doenças do tomateiro .....	16
2.4 O gênero <i>Meloidogyne</i> .....	17
2.5 Controle de <i>Meloidogyne</i> .....	19
3.6 Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	21
2.7 Indução de resistência.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Motilidade e mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	25
3.2 Controle de <i>M. incognita</i> por formulado alecrim em hidrogel .....	26
3.2.1 Obtenção do formulado alecrim em hidrogel.....	26
3.2.2 Inoculação de <i>M. incognita</i> .....	27
3.2.3 Análises nematológicas.....	27
3.3 Análises bioquímicas.....	28
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.1 Motilidade e mortalidade de <i>M. incognita</i> .....	31
4.2 Análises nematológicas.....	32
4.2.3 Análises bioquímicas.....	37
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das mais importantes na indústria alimentícia, tendo sua produção potencializada nas últimas décadas, tanto a nível mundial, quanto nacional, devido ao aumento na demanda de alimentos e industrialização em larga escala da sua produção. O sucesso da cultura se deve principalmente a alta produtividade aliada ao alto valor de mercado, o que torna sua atividade lucrativa e contribui para expansão da mesma (VILELA et al., 2012).

O tomate é uma cultura sensível e como grande parte da sua comercialização ocorre *in natura*, o cuidado com o seu aspecto deve ser redobrado. Deve-se uma atenção especial para a nutrição da planta e ao manejo correto de insetos pragas e agentes patogênicos. Dentre os patógenos que causam danos a cultura, o problema com nematoides vem ganhando destaque ao longo dos últimos anos, devido a elevadas perdas que o mesmo promove, além do difícil controle e alto índice de infestação nessa cultura.

Segundo Oliveira et al. (2009), a maior parte dos nematoides não causa danos a agricultura, pelo contrário, agem de forma benéfica, degradando e mineralizando matéria orgânica. Porém, há uma parcela que causa grandes prejuízos, os chamados fitonematoides.

O gênero *Meloidogyne* spp. é classificado como endoparasita sedentário obrigatório de raiz, que tem como característica principal a formação de galhas radiculares, que são formadas devido a hipertrofia e hiperplasia das células vegetais que esse nematoide promove durante seu ciclo (PINHEIRO, 2017).

O controle químico convencional é feito através dos nematicidas, porém esses produtos têm mostrado baixa eficácia de controle, além da necessidade de reaplicações, o que torna o seu uso bastante oneroso. Além do fator econômico, o uso de produtos químicos também traz como desvantagem a possibilidade de contaminação do meio ambiente.

O principal meio de controle se dá então de forma preventiva, usando variedades resistentes e, quando possível, controlando os fatores climáticos para que não sejam favoráveis à sua replicação. Mas também é de suma importância evitar que o nematoide chegue até a área, isso se dá principalmente

através de transporte de solos contaminados, por exemplo por meio de maquinário agrícola não higienizado corretamente.

Devido à falta de métodos de controle eficientes, cada vez mais tem se expandido as pesquisas com enfoque no controle alternativo dos nematoides, buscando métodos que além de eficazes, sejam viáveis economicamente e práticos para o uso no campo. Esses métodos incluem o uso de homeopatia e de óleos e extratos vegetais, para ativação de mecanismos de defesa, dentre outros.

O alecrim é reconhecido como planta medicinal por apresentar ação anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Dentro da fitopatologia o alecrim vem sendo estudado no controle de diversas doenças e tem mostrado um potencial nematicida a ser explorado e estudado mais a fundo, principalmente quanto a forma de aplicação e qual seu modo de ação dentro da planta tratada.

Quando se tem resultados favoráveis de controle de patógeno, como é o caso do alecrim, parte-se de duas linhas de pensamento, uma contando quanto a toxicidade direta do produto utilizado, e a outra por uma possível ativação dos mecanismos de defesa vegetal.

A indução de resistência tem como características a ação sistêmica e o efeito duradouro, que pode perdurar até meses após a aplicação, além da possibilidade de ser inespecífica, ou seja, a indução visando um patógeno pode ser eficiente para outros. Por esses motivos a indução de resistência tem chamado a atenção como forma de controle (CAMARGO, 2018).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito de toxicidade direta do extrato de alecrim sobre *M. incognita*, avaliar a eficiência desse extrato formulado com hidrogel para controle desse nematoide em tomateiro e verificar se houve a ativação de mecanismos de defesa vegetal a partir da aplicação do produto.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFIA

### 2.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L), anteriormente classificado como (*Lycopersicum esculentum* Mill), é uma dicotiledônea pertencente a ordem *Tubiflorae*, família *Solanaceae* e gênero *Solanum*. É uma planta herbácea, de caule flexível e piloso, com abundantes ramificações laterais, sendo que sua arquitetura pode ser modificada pela poda. Possui dois tipos de hábito de crescimento, determinado e indeterminado, ao qual depende da finalidade da produção (BARROSO, 1986; MINAMI; MELO et al., 2017; FILGUEIRA, 2000).

Estudos afirmam que o centro de origem do tomateiro localiza-se nos andes da América do Sul, região que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru, embora a sua domesticação tenha ocorrido no México, que é considerado como seu centro de origem secundário (MINAMI; MELLO, 2017; NAIKA et al. 2006).

Segundo Harvey, Quilley e Beynon (2002), no início do século XVI o tomate foi levado para a Europa pelos espanhóis, porém a sua aceitação foi bastante lenta, sendo inicialmente cultivado apenas como planta ornamental, uma vez que pela cor dos frutos, os mesmos eram considerados venenosos. Os italianos foram os primeiros a cultivar o tomate por volta de 1550, porém, sua maior popularização se deu no final do século XVI (FILGUEIRA, 2000; NAIKA et al., 2006).

No Brasil o tomateiro foi introduzido no final do século XIX, por imigrantes, porém, a produção industrial no país teve início apenas por volta de 1950, no estado de São Paulo. Nos anos seguintes o cultivo foi se expandido para os outros estados do país, até que em 1995 tem-se um pico de produção bastante acentuado, o qual se atribui ao desenvolvimento de novos derivados do produto, como sopas e molhos, além do surgimento de novas variedades com mais qualidade (ALVARENGA, 2008; BRITO; MELO, 2010).

Segundo dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019), a produção de tomate mundial em 2018 foi de aproximadamente 135 milhões de toneladas, das quais cerca de 91 milhões de toneladas foram destinadas para o consumo *in natura* e o restante, 44 milhões de toneladas, para a indústria. A china segue como maior produtor

mundial, sendo responsável por 31% da produção, sendo seguido pela Índia e Estados Unidos.

O Brasil encontra-se atualmente na nona posição no ranking de produção mundial, tendo produzido 4,3 milhões de toneladas, com estimativa de área plantada de 61,5 mil hectares. Dentro do cenário nacional atual o tomate é a segunda hortaliça de maior importância, sendo ultrapassada apenas pela produção de batata (IBGE, 2019).

Esse aumento exponencial da produção de tomate no país deve-se principalmente pelo fato de que a cultura possui um ciclo relativamente curto, encaixa-se em diferentes sistemas de cultivo, tem um valor econômico elevado e devido a estudos e melhoramento genético, hoje tem-se uma alta produtividade. Essa produção não é ainda maior devido a sua suscetibilidade a pragas e doenças, o que dificulta o seu manejo, aumentando os gastos com tratamentos culturais (VILELA et al., 2012).

### 2.3 Doenças do tomateiro

Rezende, Massola Júnior e Bedendo (2018) caracterizam doença com um fenômeno que interfere de forma prejudicial em processos fisiológicos da planta, levando a redução de sua eficiência. É importante ressaltar que essa interferência ocorre de forma contínua e não apenas momentânea. O agente causal pode tanto ser de origem biótica, que seriam as bactérias, fungos, nematoides e afins, como também abióticos, que são de natureza nutricional ou ambiental.

As doenças dentro da cultura do tomate irão variar dependendo da época do ano, temperatura, localidade, variedade e manejo, entre outros fatores. Porém, algo em comum a todos os casos é que o manejo das doenças apenas é eficiente quando é estudada a interação entre patógeno, planta e ambiente, e executado de maneira integrado (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

Devido a ser um hospedeiro para uma ampla gama de patógenos, a produção de tomate requer a utilização de grande quantidade de agroquímicos. Segundo dados da ANVISA (2013), um estudo realizado em 2011 pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que analisou 151 amostras de tomate, 12% delas exibiam resíduos de agrotóxicos acima do limite



máximo permitido, provando que o tomateiro é umas das culturas mais problemáticas nesse sentido (COELHO et al., 2018; VILELA et al., 2012).

O crescimento da conscientização da população quanto a importância de uma alimentação saudável e o maior conhecimento sobre os efeitos dos usos de agroquímicos, além da busca em diminuir os custos de produção, maximizando os lucros, tem feito com que a procura pela produção orgânica tenha subido bastante na última década (CARNEIRO, 2011; LUZ; SHINZATO; SILVA, 2007).

Segundo Inoue-Nagata et al. (2016), dentre as principais doenças do tomateiro destacam-se Mosaico-Dourado, Vira-Cabeça, Amarelão, Risca, Nematóide das galhas, Mancha bacteriana, Pinta bacteriana e Necrose da medula, entre outras. Dentre estas, os nematoides têm ganhado destaque, uma vez que as perdas na produção são bastante impactantes e a falta de métodos eficientes de controle tem sido um grande problema (MAFESSONI, 2019).

Dentro da tomaticultura, o principal gênero de nematoides que causa danos mais expressivos é *Meloidogyne*. No mundo ainda encontram-se problemas em menor escala com outros gêneros como *Belonolaimus*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*. Porém, no Brasil, os problemas são praticamente restritos apenas ao gênero *Meloidogyne*, com as *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (PINHEIRO, 2017).

#### 2.4 O gênero *Meloidogyne*

Segundo Oliveira et al. (2009), a maior parte dos nematoides não causa danos a agricultura, pelo contrário, agem de forma benéfica, degradando e mineralizando matéria orgânica. Porém, há uma parcela que causa grandes prejuízos, os chamados fitonematoídeos. Os danos causados por qualquer espécie de nematoídeo irá depender da relação densidade populacional/massa de raízes, assim como o vigor das plantas e sua capacidade de tolerar altas populações desse patógeno (FERREIRA; FERRAZ; FREITAS, 2012; FREITAS et al., 2012).

Segundo Pinheiro, Pereira e Suinaga (2014), os danos causados pelo parasitismo dos nematoides podem ser tanto diretos quanto indiretos, afetando a produtividade e diminuindo a sobrevivência das plantas. Na cultura do tomate

no Brasil o gênero que mais se destaca é o *Meloidogyne*, que podem ocasionar danos de produtividade entre 30% e 80%.

Existe uma ampla gama de espécies dentro do gênero *Meloidogyne*, onde mais de 90 espécies estão classificadas, sendo destacadas entre como principais *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (LIMA et al., 2016). Para a sua identificação, a melhor forma é utilizar as características morfológicas. Em geral essa identificação é feita através da região perineal da fêmea ou pelo teste com hospedeiros diferenciados no caso de raças (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

O gênero *Meloidogyne* é considerado um dos parasitas de raiz mais evoluídos, o que se deve a sua grande capacidade de adaptação e a conseguirem parasitar um grande número de hospedeiros, o que também dificulta seu controle (MOREIRA et al., 2015).

Fatores ambientais como umidade e temperatura podem interferir no ciclo e no desenvolvimento desse nematoide. Porém, de forma geral, a sua maior ocorrência se dá em solos arenosos e com temperaturas acima de 25 °C, embora possa ocorrer em uma faixa ampla de temperatura, entre 5 e 40 °C (PINHEIRO; PEREIRA; SUINAGA, 2014; PINHEIRO et al., 2014).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. inicia-se com a deposição de ovos, que são envoltos por uma matriz gelatinosa. A evolução embrionária forma o juvenil de primeiro estágio (J1), e após, ainda dentro do ovo, ocorre uma ecdise que resulta no juvenil de segundo estágio (J2), que será a forma que irá eclodir (ABAD et al., 2009; TIHOHOD, 1993).

A eclosão dos juvenis de segundo estágio dos ovos se dá através da força mecânica do estilete combinada com a ação enzimática de quitinases (ABAD et al., 2009). A movimentação desses nematoides após a eclosão ocorre através do gradiente de exsudatos radiculares até a área de alongamento das raízes, onde penetram o sistema radicular com o auxílio do estilete (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). Internamente às raízes a migração ocorre entre as células, onde os J2 migram até o ápice radicular e na zona de diferenciação se voltam para a porção central da raiz, retornando a parte superior, migrando até o pró-câmbio e estabelecendo o sítio de alimentação (HOLBEIN; GRUNDLER; SIDDIQUE, 2016).

As primeiras penetrações do estilete são acompanhadas de secreções que causam um crescimento das células, levando à formação das "células gigantes" nutridoras, as quais são essenciais para a alimentação e desenvolvimento do patógeno. Após o estabelecimento da relação parasitária estável, o J2 passa por mais três ecdises, o que resultará no adulto, onde as fêmeas possuem formato piriforme avantajado e os machos um formato mais vermiforme. Em geral, a reprodução é partenogênica (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996; LIU; THOMAS; WILLIAMSON, 2007).

As fêmeas adultas iniciam a fase sedentária, na qual permanecerá durante o restante do seu ciclo, o que resultará no amadurecimento da fêmea, formação e liberação de ovos. Já os machos adultos não se alimentam, saem da raiz e se movem livremente no solo (ESCOBAR et al., 2015; TIHOHOD, 1993).

O sintoma atribuído ao gênero *Meloidogyne* é bastante característico, uma vez que, devido a hiperplasia e hipertrofia das células vegetais no sítio de alimentação, formam-se as galhas. Já na parte aérea das plantas parasitadas é possível observar redução no porte e deficiência nutricional, sintomas que costumam aparecer em forma de reboleiras nas áreas de cultivo (MELO et al., 2012; MATTEI, 2018).

O gênero *Meloidogyne* tem importância especial nas hortaliças cultivadas, tais como alface, batata, cenoura, pimentas, pimentões, tomate e cucurbitáceas, devido aos danos expressivos, já que muitas delas são hospedeiros do gênero, dificultando assim as opções de rotação de cultura. O problema é intensificado quando o cultivo ocorre em clima tropical e próximo as áreas urbanas, como é o caso de uma grande parte das plantações hortícolas no Brasil, uma vez que temperaturas elevadas favorecem a reprodução desses nematoides e a localização próximo a centros de grande movimentação favorecem sua disseminação (INOUE-NAGATA et al., 2016; PINHEIRO, 2017).

## 2.5 Controle de *Meloidogyne*

O controle químico dos nematoides é feito com os chamados nematicidas, produtos esses que no geral apresentam alta toxicidade, os quais, em decorrência do uso contínuo, podem ocasionar problemas ambientais e selecionar nematoides resistentes (JARDIM; ANDRADE; DE QUEIROZ, 2009). No Brasil,

alguns desses produtos já tiveram seus registros cancelados. O uso desses produtos químicos além do risco eminente ao meio ambiente, também aumenta os custos de produção, pois a maioria requer altas doses e mais de uma aplicação, e mesmo assim nem sempre são efetivos no controle (SANTOS, 2012).

A estratégia mais eficaz no controle desses nematoides é a resistência genética, que no caso do tomate tem-se a possibilidade da resistência a *M. incognita* pela introdução do gene Mi, que induz a necrose localizada de tecido alimentador do nematoide logo após a infecção (BARCALA et al., 2016). Porém, é de grande importância para a eficácia do controle, que este ocorra de forma integrada, ou seja, apenas a resistência não resolve, deve-se pensar em outras técnicas para acompanhá-la, como o controle biológico.

O controle biológico se destaca como medida em ascensão nos últimos anos, como uma alternativa viável para o controle de nematoides. Esse tipo de controle baseia-se nas interações bem-sucedidas, que podem ser proporcionadas pela ação de microrganismos benéficos, pela predação direta, indução de resistência ou pela tolerância vegetal pela ativação de mecanismos de defesa relacionados com barreiras físicas do tecido vegetal (SOARES et al., 2017; VERMA et al., 2013; ZEILINGER et al., 2015).

Para o controle de nematoides atualmente no Brasil destacam-se principalmente as bactérias do gênero *Bacillus*, as quais algumas como por exemplo *Bacillus firmus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* já possuem registros para determinadas culturas (ADAPAR, 2019). Outros métodos têm sido testados e bem aceitos na comunidade científica, como por exemplo o uso de óleos essenciais e extratos de plantas (MELO et al., 2012).

Diversos extratos de plantas medicinais já foram testados no controle de *M. incognita*, como no trabalho de Martins e Santos (2016), cujos resultados mostram o capim citronela, a hortelã e a menta com atividade nematicida, com mais de 70% de J2 considerados mortos após 48 horas de contato direto com esses extratos. A mortalidade total ocorreu em extratos de lombrigueira, agrião-do-brejo e mastruz.

Outro exemplo é o trabalho de Mioranza et al. (2016), que testou concentrações de extrato de *Curcuma longa* sobre *M. incognita*, constatando que na maior concentração (15%), houve 90% de mortalidade após 24 horas de

contato. Nesse estudo os ovos do nematoide também foram expostos ao extrato por 15 dias e verificou-se que todas as concentrações do extrato reduziram a eclosão de *M. incognita*.

No estudo de Coltro-Roncato et al. (2018) buscou-se testar diferentes formas de aplicação do extrato de *Crambe abyssinica* para o controle de *M. incognita* em tomateiro, levando assim a pesquisa para a parte prática e aplicável. Nesse caso os autores concluíram que esse extrato aplicado via solo semanalmente foi promissor para o manejo de *M. incognita* na cultura do tomateiro.

### 3.6 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta de origem Mediterrânea, que é cultivada na maioria dos países que possuem clima temperado. O porte do alecrim é classificado como subarbustivo lenhoso, com caule ereto, pouco ramificado e que pode atingir até 1,5 m de altura. As folhas são coriáceas e aromáticas, de tamanho pequeno, entre 1,5 a 4 cm (LORENZI; MATOS, 2006).

Ainda segundo Lorenzi e Matos (2006) a planta de alecrim é classificada como: classe Magnoliopsida, ordem Lamiales, família Lamiaceae, gênero *Rosmarinus* e espécie *Rosmarinus officinalis*. A característica mais marcante da planta é seu aroma, tendo seu nome (*rosmarinus*) vindo do latim, o que significa orvalho do mar (PORTE; GODOY, 2001).

O poder antioxidante e conservante do alecrim é reconhecido e muito difundido na indústria alimentícia, pelas propriedades de seus diterpenos, além de ser usado como aromatizante, no preparo de xaropes e infusões, tintura, pó e óleo essencial (DALMARCO, 2012).

O alecrim é considerado uma planta medicinal por apresentar ação anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Entre os constituintes do extrato de alecrim, cerca de 90% da sua ação antioxidante é atribuída ao carnosol e ácido carnósico. Além disso, apresenta compostos como pineno, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora, ácidos orgânicos, saponina, traços de alcaloides, taninos e ácido rosmarínico (ALTINIER, 2007; TESKE; TRENTINI 1997).

O potencial do alecrim no controle de fitopatógenos tem sido verificado em diversos patossistemas, tais como *Pseudocercospora vitis* e *Plasmopara viticola* em videira por Maia et al. (2014), *Ralstonia solanacearum* em pimentão por Martins et al. (2010) e *Macrophomina phaseolina* em soja por Lorenzetti et al. (2016). E ainda sua ação direta foi demonstrada em estudo *in vitro* onde houve efeito sobre *Alternaria solani*, *Bipolaris oryzae*, *Diplodia maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* tratados com extrato bruto de alecrim (RODRIGUES et al., 2010).

No trabalho de Mattei et al. (2014), foi observada uma diminuição na população de *Meloidogyne javanica* em plantas de soja tratadas com óleo essencial de alecrim, porém, o mesmo não teve efeito em *Pratylenchus brachyurus*, o que reforça a ideia de que o alecrim tenha uma ação sobre nematoides do gênero *Meloidogyne*.

No trabalho "Eclosão e mortalidade de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* raça 2 em óleos essenciais" de Moreira, Santos e Inneco (2009), onde testou-se a eficiência dos óleos essenciais de alfavaca, alecrim pimenta, capim santo, capim citronela, cidreira e eucalipto, os óleos de alecrim pimenta e capim citronela foram os que se mostraram mais efetivos no controle, indicando potencial de sua utilização no manejo integrado de nematoides das galhas.

No trabalho de Schons e Stangarlin (2016) foi testado o formulado de hidrogel com alecrim, ao qual teve efeito sobre a quantidade de ovos e J2 na raiz de tomateiro na maior dose testada, concluindo-se que doses maiores proporcionariam um melhor resultado. Porém, não foi elucidado nesses trabalhos se o controle ocorre por um efeito de toxicidade ou se o alecrim é capaz de ativar algum mecanismo de defesa da planta hospedeira.

## 2.7 Indução de resistência

Segundo Stangarlin (2011), a resistência de hospedeiro é a resposta da planta a tentativa de penetração do patógeno, tentando evitar a entrada do patógeno ou sua ação posterior. As barreiras de defesa podem ser estruturais ou bioquímicas, que podem ainda ser classificadas em pré e pós-formadas em relação à tentativa de infecção do patógeno. Os mecanismos pré-formados também são chamados de passivos ou constitutivos, enquanto os pós-formados

fazem parte do sistema de defesa latente na planta, ao qual será ativado na presença do patógeno, evitando gastos energéticos desnecessários (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Apesar de a resistência pré-formada ser o principal mecanismo quando se pensa em resistência não-específica, quando se trata de indução de resistência, os mecanismos de defesa pós-formados tem papel fundamental (STANGARLIN et al., 2011). O maior foco de estudos fitopatológicos se dá em torno da resistência pós-formada (LORENZETTI et al., 2018).

Quando a ativação de mecanismos de defesa ocorre de forma sistêmica, é chamado de Resistência Sistêmica (SR), que tem como característica, além do efeito sistêmico, apresentar um efeito duradouro, que pode persistir por semanas ou até meses, e pode ser inespecífico, ou seja, o tratamento pode proteger a planta não só apenas contra um patógeno, mas também contra outros patógenos. Por esses motivos a indução da resistência sistêmica tem chamado bastante a atenção como forma de controle (CAMARGO, 2018).

Dentro da Resistência Sistêmica existe uma subdivisão em duas categorias: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI). Essa é uma divisão mais didática, uma vez que ambas funcionam da mesma forma, porém, o que as difere é a sua forma de ativação. De forma muito generalizada, pode-se dizer que a RSA é sinalizada a partir da rota hormonal da via do ácido salicílico e induzida por agentes necrotróficos, enquanto a RSI é sinalizada pela via do ácido jasmônico e do etileno e induzida por bactérias não patogênicas e promotoras de crescimento (rizobactérias) (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; CAMARGO, 2018; HENRY; THONART; ONGENA, 2012).

A ativação dos mecanismos de defesa após a chegada do patógeno é interessante principalmente quando se pensa em gasto energético. A planta possui um pool limitado de recursos a serem investidos em crescimento, desenvolvimento e defesa, sendo que no caso da indução de resistência a planta só apresentará um custo na presença do patógeno, economizando recursos, e mesmo com a chegada desse, haverá uma compensação pelo atraso temporal na expressão da defesa (KUHN, 2007).

A indução de resistência nas plantas envolve a ativação de alguns mecanismos de defesa, por exemplo fitoalexinas e enzimas como peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. Essa ativação pode se dar tanto por fatores bióticos, como a presença do patógeno, como por fatores abióticos, como a aplicação de indutores químicos ou de extratos vegetais (MAZARO et al., 2008; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

A ação dessas proteínas na resistência das plantas contra patógenos pode ser direto, quando ocorre a inibição do crescimento ou da germinação do patógeno, ou indireto, agindo na indução de resistência. Na indução de resistência a fenilalanina amônia-liase tem papel importante nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos, sendo responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando em ácido *trans*-cinâmico e amônia (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

As peroxidases foram classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas - RP) pertencentes à família RP-9 por Van Loon e Van Strien (1999). As enzimas desse grupo são estudadas nos processos de defesa e resistência da planta por terem importante papel na lignificação, suberização e metabolismo da parede celular, e ainda podem estar envolvidas em respostas de hipersensibilidade e produção de fitoalexinas (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

O grupo das polifenoxidasas são as enzimas responsáveis pela catalisação da reação de oxidação de polifenóis para transformá-los em quinonas. Em geral encontram-se dormentes, porém, são liberadas quando ocorre uma ruptura, seja dano mecânico ou por ação de insetos e patógenos, iniciando assim o processo de oxidação dos compostos fenólicos transformando-os em quinonas, sendo as quinonas um fator antinutritivo na alimentação do invasor, impedindo a digestão do mesmo (KUHN, 2007).

Essas três enzimas estão fortemente ligadas à síntese da lignina a partir de compostos fenólicos, na via dos fenilpropanóides. Quando os nematoides infectam a planta ativam genes específicos, além de ativar a síntese dessas mesmas enzimas, que podem prejudicá-los. Esse recurso bioquímico de defesa pode ser induzido previamente ao contato dos nematoides com as plantas com a aplicação de produtos indutores, resultando em um controle mais eficiente (SANKAR et al., 2017; MATTEI, 2018).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Motilidade e mortalidade de *Meloidogyne incognita*

O experimento *in vitro* para verificar a motilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* seguiu a metodologia proposta por Coltro-Roncato et al. (2016), o qual foi conduzido no Laboratório de Nematologia da Unioeste, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). O mesmo foi composto por cinco tratamentos e cinco repetições, totalizando 25 parcelas experimentais, sendo cada parcela correspondente a um frasco com tampa e capacidade para 50 mL. Os tratamentos foram compostos das concentrações 1%, 3%, 5% e 10% de extrato e para a testemunha foi utilizado água destilada. Os tratamentos foram obtidos através da diluição do extrato de alecrim proveniente de produto comercial ao qual possuía a concentração inicial de 21% de alecrim.

Para que fosse obtida uma população contendo apenas J2 do nematoide, uma suspensão extraída conforme o método proposto por Collen e D'Herde (1972) foi submetida ao funil de Baermann (1917), onde um funil de vidro foi acoplado a um suporte e dentro de sua cavidade foi colocado um papel filtro chanfrado, cobrindo toda a superfície, porém sem aderir a parede do funil. Ao final do mesmo foi acoplado uma mangueira de borracha com uma presilha. O líquido contendo os nematoides foi colocado no funil, com a presilha impedindo que o líquido saísse do funil. Após 48 horas a presilha foi retirada e o líquido contendo os J2 foi recolhido em um béquer.

Para a avaliação de motilidade e mortalidade foram colocados em cada frasco 8 mL de cada tratamento + suspensão contendo 240 J2 de *M. incognita*. Após 24 horas foram contados o número de nematoides que se moviam, aos quais se concluiu como vivos, e a quantidade de nematoides imóveis. Em seguida o líquido foi vertido em peneira de 400 Mesh, e recolhidos novamente nos tubos, onde os tratamentos foram substituídos por água destilada.

Após mais 24 horas foi realizada nova contagem, onde foi adicionado, no momento da avaliação de cada amostra, 10% (v:v) de hidróxido de sódio 1 N (1%), afim de excitar os nematoides vivos. Para a contagem foram considerados mortos os nematoides que se mantiverem imóveis, retílineos ou que apresentarem aspecto incomum.

Essa avaliação teve como principal objetivo avaliar o efeito nematostático do extrato de alecrim, ao qual por vezes pode ser confundido com o efeito nematotóxico. O efeito nematostático corresponde a imobilidade dos nematoides quando em contato com o produto, porém, assim que o produto é retirado, nesse caso substituído por água destilada, estes voltam a movimentar-se normalmente. Por isso a necessidade da segunda avaliação, onde é possível verificar o controle efetivo que o extrato de alecrim promove.

As avaliações foram realizadas com auxílio de microscópio óptico e a contagem em lâmina de Peters. Os dados foram transformados em porcentagem, submetidos a análise de variância e teste de regressão do tipo Plateu, utilizando o programa SAS University Edition (SAS INSTITUTE Inc, 2014).

### 3.2 Controle de *M. incognita* por formulado alecrim em hidrogel

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC), cujos tratamentos corresponderam as doses do formulado alecrim em hidrogel, sendo elas 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 g do formulado por cova. Contando ainda com duas testemunhas, a chamada dose 0, que correspondeu a 1,25 g de hidrogel sem adição de extrato de alecrim, e a testemunha absoluta, correspondendo apenas a água destilada. Foram utilizadas cinco repetições, resultando assim em 30 parcelas experimentais para o experimento visando avaliar os parâmetros nematológicos, sendo que cada parcela correspondeu a um copo de 1 L, contendo uma mistura de 3:1 de substrato e húmus, ambos comerciais e não autoclavados.

Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de regressão pelo programa SAS University Edition (SAS INSTITUTE Inc, 2014).

#### 3.2.1 Obtenção do formulado alecrim em hidrogel

O extrato de alecrim utilizado foi de produto comercial, onde o mesmo possuía uma concentração de 21%, ao qual foi diluído até obtenção de concentração de 15%. Para cada 1 L do extrato líquido foi adicionado 12 g de hidrogel Gel Plant (seguindo recomendação do fabricante), onde se obteve uma

massa com consistência pastosa, a qual foi reservada por aproximadamente 24 horas, até que o hidrogel absorvesse completamente o extrato.

Após o período de repouso, a mistura foi levada a estufa a 60 °C, por 48 horas, até que o mesmo voltasse a consistência sólida; esse material foi então batido em liquidificador para se obter o pó, que correspondeu ao formulado. O produto foi pesado em balança analítica, para a obtenção das doses, as quais foram depositadas na cova no momento do transplântio das mudas.

### 3.2.2 Inoculação de *M. incognita*

As mudas de tomateiro utilizadas foram adquiridas em agropecuária, com aproximadamente 20 dias de emergência. A variedade utilizada foi Santa Clara por ser conhecida como sendo suscetível a *M. incognita*.

O inóculo foi obtido através da metodologia descrita por Collen e D'Herde (1972), onde as raízes contendo populações puras de *M. incognita* foram seccionadas e trituradas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% em liquidificador por aproximadamente 30 segundos. A suspensão passou por um conjunto de peneiras sobrepostas de 60 e 500 Mesh e o conteúdo retido nesta última recolhido em um bquer para contagem. Como a amostra mostrava-se bastante limpa, descartou-se as etapas de centrifugação.

Foi realizada contagem em câmara de Peters em microscópio ótico. Foram inoculados 1.000 ovos + J2 de *M. incognita* por parcela experimental para o experimento de análises bioquímicas e 2.000 nematoides por parcela no experimento de variáveis nematológicas. Em ambos os casos a inoculação ocorreu três dias após a aplicação dos tratamentos e transplântio das mudas.

### 3.2.3 Análises nematológicas

Após 45 dias da inoculação foi realizada a coleta do material afim de avaliar as variáveis nematológicas para determinar a eficácia do formulado de alecrim em hidrogel no controle de *M. incognita*.

Para a quantificação das massas de ovos seguiu-se a metodologia de coloração com floxina B (TAYLOR; SASSER, 1978), onde as raízes após lavadas em água corrente foram colocadas em um recipiente totalmente encobertas pela solução corante durante 20 minutos. Após esse tempo foram

retiradas e lavadas para eliminar o excesso de corante. A contagem considerou o número de galhas coloridas como correspondente as que continham massas de ovos.

Posterior a isso, foi realizada a extração de ovos e J2, conforme descrito no item 3.2.2, e contagem em câmara de Peters em microscópio ótico.

Para obter o fator de reprodução foi utilizada a população inicial, ou seja, a quantidade de nematoides inoculados (ovos + J2), e ainda a quantidade de *M. incognita* encontrado na raiz após 45 dias de inoculação, que correspondeu a população final. O Fator de Reprodução (FR) foi calculado conforme metodologia de Oostenbrink (1966), onde a população final é dividida pela população inicial (inóculo) ( $FR = Pf/Pi$ ), e conforme os resultados obtidos são classificados como: planta suscetível, com FR superior ou igual a 1,0; planta resistente, com FR inferior a 1,0; e planta imune com FR igual a zero.

### 3.3 Análises bioquímicas

Neste caso foram utilizadas três repetições para cada um dos cinco tempos referentes as coletas para as análises bioquímicas, totalizando 90 parcelas experimentais.

As análises bioquímicas basearam-se em coletas de raízes em diferentes tempos. Foram coletadas aproximadamente 0,5 g da raiz, na região média da mesma no momento da inoculação e aos 5, 10, 20 e 50 dias após a inoculação. Assim que retiradas da planta, as raízes foram lavadas em água corrente, secas em papel toalha, pesadas, imediatamente acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Após todas as coletas, as amostras foram trituradas com 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado com o auxílio de nitrogênio líquido. O líquido obtido foi centrifugado a 6.000g durante 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado em microtubos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para as posteriores análises bioquímicas.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada através da quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato L-fenilalanina segundo a metodologia descrita por Umesha (2006). Para isso fez-

se a mistura de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, 450  $\mu\text{L}$  da solução tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de solução de L-fenilalanina (0,050 M em tampão Tris HCl 0,025 M, pH 8,8). A mistura foi incubada a 40 °C por aproximadamente 2 h. Após esse período foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M para cessar a reação e, em seguida, realizada a leitura em espectrofotômetro a 290 nm, utilizando cubeta de quartzo. A absorbância foi determinada pela diferença das amostras em comparação ao controle, não contendo a fração proteica, sendo que a atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido trans-cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

Para a determinação da atividade de peroxidase foi seguida a metodologia proposta por Hammerschmidt et al. (1982), utilizando uma solução substrato contendo 12,5 mL de guaiacol 2%, 310  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio e 87,5 mL de tampão fosfato de pH 7,0. Essa solução foi mantida em banho-maria a 30 °C. No momento da leitura misturou-se 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra 950  $\mu\text{L}$  da solução substrato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm em cubetas de vidro, sendo anotado os valores de absorbância a cada 15 segundos durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, descontando-se os valores de absorbância do controle.

Para determinação da atividade das polifenoloxidasas foi utilizada a metodologia de Duangmal e Apenten (1999), utilizando solução substrato composta por 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0) e 0,110 g de catecol. A solução foi mantida em banho-maria a 30 °C. Para a reação misturou-se 50  $\mu\text{L}$  da amostra e 950  $\mu\text{L}$  do substrato, sendo imediatamente feitas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm utilizando cubetas de vidro, a cada 15 segundos durante 1 minuto. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para a determinação da atividade, os resultados foram expressos em absorbância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A determinação de proteínas totais foi realizada seguindo o método proposto por Bradford (1976), onde 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram misturados a 600  $\mu\text{L}$  de solução de tampão fosfato 5 M (pH 7,0) e, sob agitação em vórtex, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de solução de Bradford. Após 10 minutos foram realizadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm, com cubetas de vidro. A concentração de proteínas expressa em termos equivalentes  $\mu\text{g}$  de albumina

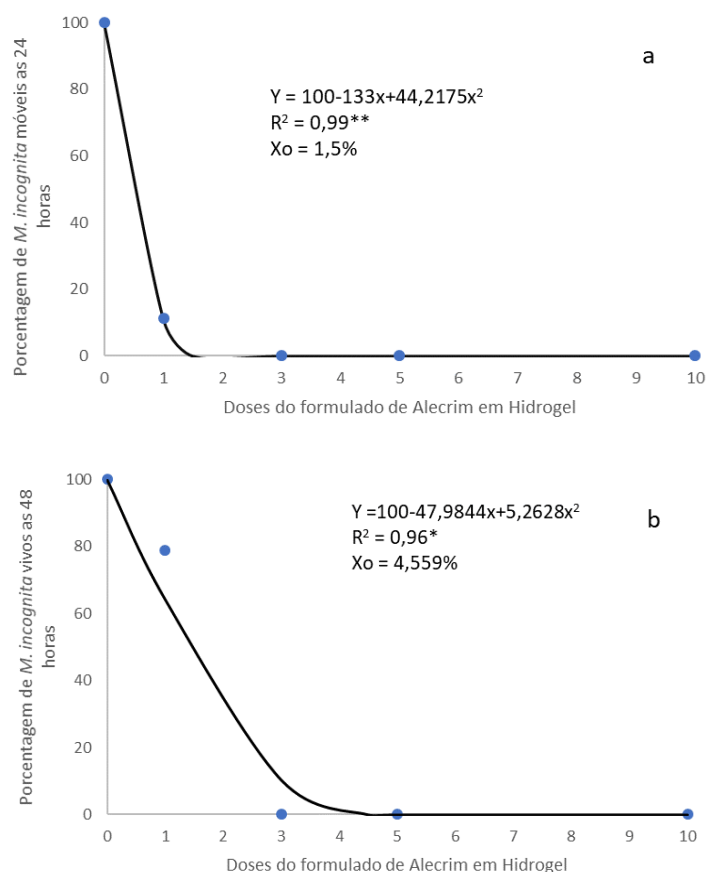
de soro bovino (ASB) em um mL de amostra ( $\mu\text{g}$  proteína  $\text{mL}^{-1}$ ), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentração de ASB.

Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de regressão pelo programa SAS University Edition (SAS INSTITUTE Inc, 2014).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Motilidade e mortalidade de *M. incognita*

A avaliação realizada após 24 horas de contato direto de *M. incognita* com as doses do extrato de alecrim, mostrou uma redução bastante expressiva na porcentagem de nematoides móveis já na primeira dose (1%), quando comparado a testemunha contendo apenas água destilada. A partir da dose calculada de 1,5% não se encontravam mais nematoides em movimento (Figura 1a). Na segunda avaliação, às 48 horas, foram consideradas as porcentagens de nematoides mortos e vivos, e calculado o ponto de mínima, ou seja, a dose onde a partir dela não se encontrou mais nematoides vivos, que foi de 4,5% (Figura 1b).



**Figura 1** - Porcentagem de *Meloidogyne incognita* imóveis após 24 horas (a) e mortos após 48 horas (b) de contato direto com o formulado de alecrim em hidrogel nas concentrações 0 (testemunha, correspondente a água destilada), 1%, 3%, 5% e 10%. \*\*Significativo a 1% de probabilidade e \*significativo a 5% de probabilidade de acordo com teste de regressão do tipo Plateu.

Esses resultados mostram que o efeito do contato direto do extrato de alecrim com *M. incognita* não é apenas nematostático, mas que também existe um efeito de toxicidade. O mesmo comportamento foi observado no trabalho de Müller et al. (2014), onde as maiores doses do extrato aquoso de alecrim, próximas de 10%, apresentaram maior redução tanto na motilidade quanto na mortalidade de *M. incognita*.

Outros extratos vegetais também demonstraram efeito nematicida sobre J2 de *M. incognita*, tais como extrato aquoso de orégano (*Origanum syriacum*) (IBRAHIM; TRABOULSI; EL-HAJ, 2006) e de *Tagetes patula* (MARAHTTA et al., 2012), com um controle menor, de apenas 16% e 31,5% nas maiores concentrações, respectivamente.

No trabalho de Wang et al. (2012) foi possível observar que o ácido rosmarínico, um dos principais componentes do alecrim, tem forte efeito nematicida, alcançando mortalidade semelhante à do presente trabalho na concentração de 3 mg L<sup>-1</sup> após 48 horas de exposição, uma possível explicação para o resultado obtido.

#### 4.2 Análises nematológicas

Nesse experimento foram utilizadas duas testemunhas, a primeira, chamada no decorrer do trabalho como testemunha, que corresponde a não adição de nenhum tipo de tratamento, enquanto a segunda testemunha, denominada dose 0, corresponde a aplicação apenas de hidrogel sem adição de alecrim. Ao fazer o teste de comparação de médias de Dunnett, que tem como objetivo comparar os tratamentos com a testemunha, foram realizadas duas comparações, as médias dos tratamentos, incluindo o tratamento 0, com a testemunha e ainda a comparação das doses com a segunda testemunha, a dose 0, como é possível observar na Tabela 1.

Em todas as variáveis analisadas as testemunhas diferiram estatisticamente das doses do formulado. Nas variáveis massa de ovos e número de galhas tanto a testemunha quanto a dose 0 mostraram um resultado estatisticamente superior aos demais, ou seja, a aplicação do formulado alecrim em hidrogel, em qualquer dose, resulta em uma diminuição nessas variáveis, o que corresponde ao controle.



**Tabela 1** – Efeito do formulado alecrim em hidrogel em comparação as testemunhas nas variáveis nematológicas quantidade de massas de ovos (MO), quantidade total de galhas, número total de nematoides por raiz, número de nematoides por grama de raiz ( $N\ g^{-1}$  raiz) e fator de reprodução (FR) em plantas de tomateiro inoculadas com *M. incognita*.

Tratamentos	MO	Galhas	Nematoides	$N\ g^{-1}$ raiz	FR
Testemunha	185,20 aA	380,75 aA	32442,50 a+B	1580,69 a+B	16,22 a+B
0	194,30 aA	335,60 aA	21830,00 -bA	1018,95 -bA	10,92 -bA
0,25	110,40 -b-B	220,20 -b-B	10272,00 -b-B	406,45 -b-B	5,14 -b-B
0,5	86,80 -b-B	157,00 -b-B	8280,00 -b-B	425,85 -b-B	4,14 -b-B
0,75	36,40 -b-B	59,80 -b-B	3248,00 -b-B	152,36 -b-B	1,63 -b-B
1	40,80 -b-B	64,60 -b-B	4100,00 -b-B	207,59 -b-B	2,05 -b-B
1,25	29,60 -b-B	47,40 -b-B	2960,00 -b-B	118,84 -b-B	1,48 -b-B
CV(%)	20,56	14,41	28,62	29,3	28,61

Os tratamentos correspondem à quantidade (g) do formulado por cova de transplantio. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunett a 5% de probabilidade.

Letras minúsculas representam a comparação dos tratamentos em relação a testemunha; Letras maiúsculas correspondem a comparação dos tratamentos em relação ao tratamento 0 (hidrogel sem adição de alecrim).

Sinal negativo significa que foi inferior, enquanto o sinal positivo que foi superior.

Já nas variáveis número total de nematoides, nematoides por grama de raiz e fator de reprodução, quando se compara a testemunha com todas as doses, tem-se uma diferença estatística, ou seja, apenas a simples adição de hidrogel, sem a presença do alecrim, causa uma redução nessas variáveis, o que pode ser causado pelo impedimento físico que o hidrogel provoca, formando uma barreira em torno da raiz, dificultando a entrada dos nematoides.

Outra explicação possível é que a composição química do hidrogel tenha causado alteração na bioquímica da rizosfera das plantas, alterando o gradiente de exsudatos radiculares. É através desse gradiente de exsudatos radiculares que o juvenil de *Meloidogyne*, fase infectiva, movimenta-se no solo até a parte de alongamento radicular (FERRAZ, 2018). Uma alteração na composição pode resultar em desorientação desses nematoides, fazendo com que a quantidade deles que cheguem até as raízes seja menor.

No trabalho de Zhou et al. (2015) é possível constatar que a composição bioquímica da rizosfera interfere na microfauna dessa região. O autor analisou as bactérias presentes na rizosfera e afirma que pequenas alterações bioquímicas podem mudar toda a composição microbiana, reforçando a teoria

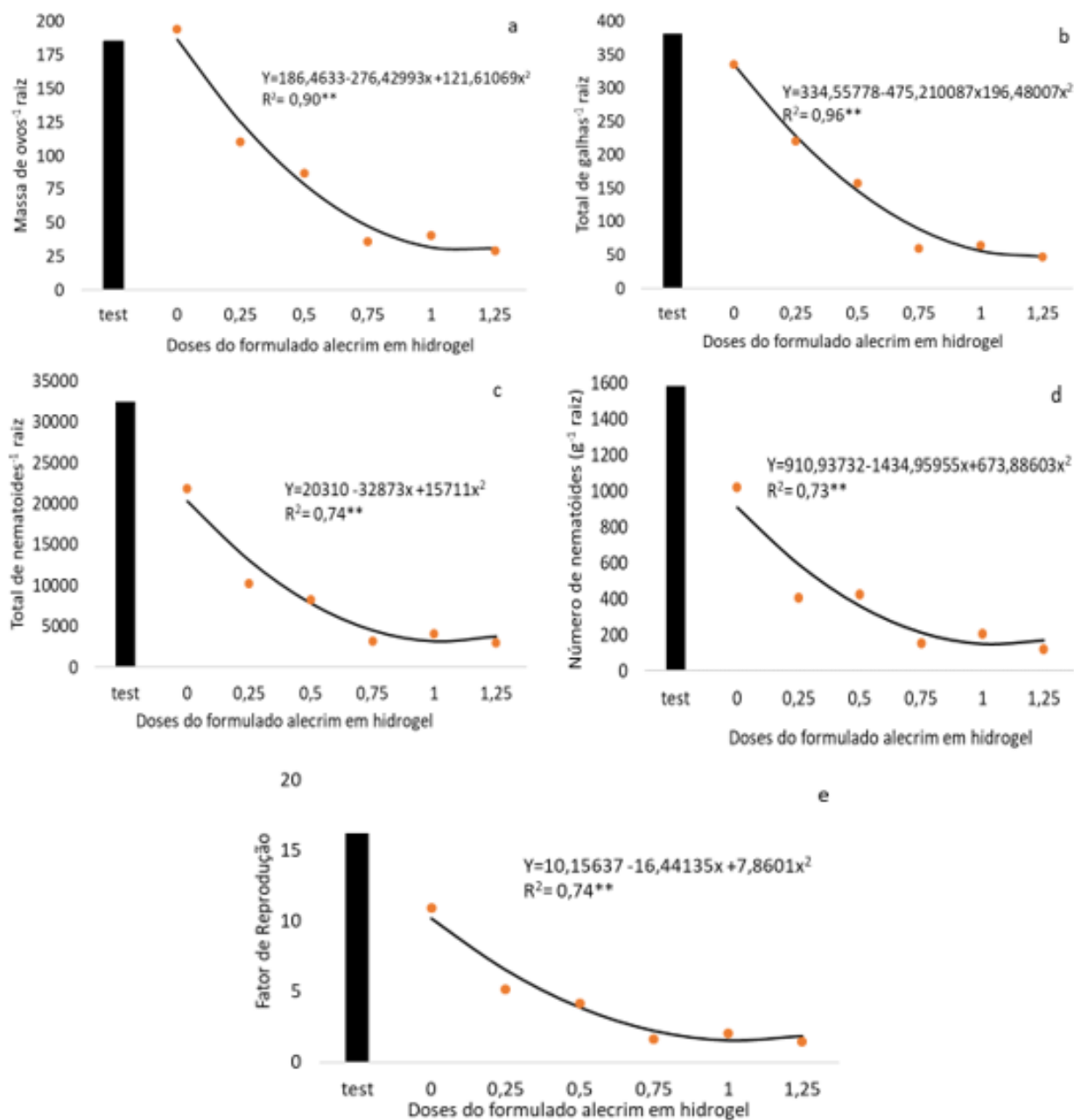
anteriormente citada. A interação composição bioquímica da rizosfera x população de nematoides ainda é pouco estudada, porém é um ponto bastante importante a ser observado em trabalhos futuros.

É possível ainda considerar que o hidrogel retém uma grande quantidade de água, sendo essa uma de suas principais características, resultando assim em uma diminuição na água livre em torno das raízes. Os nematoides presentes no solo necessitam de água livre para movimentar-se até as raízes e iniciar seu processo infeccioso (PINHEIRO, 2017; FERRAZ, 2018). Uma restrição nesse sentido seria prejudicial ao seu deslocamento, conseqüentemente diminuindo sua taxa de infestação.

O trabalho de Charchar et al. (2005) corrobora com os resultados encontrados, uma vez que ao testar oito cultivares de ervilha em diferentes lâminas de água, observou-se que o fator de reprodução de *M. incognita* foi significativamente reduzido nas menores lâminas de água testadas.

Assim como também ocorreu no trabalho de Quintela et al. (2015), onde foi observado o patossistema cana-de-açúcar x *M. incognita* e os tratamentos com menor água disponível foram os que apresentaram menor número de ovos g<sup>-1</sup> raiz e menor fator de reprodução. Os autores deste trabalho atribuem essa diminuição a três fatores: primeiro a dificuldade de locomoção e colonização, como já citado anteriormente, mas também trazem como questão a desidratação da matriz gelatinosa que recobre os ovos de *M. incognita*, interrompendo seu ciclo de vida, e ainda que o baixo suprimento de água faz com que as raízes desenvolvam camadas mais espessas, dificultando a penetração do parasita, dependendo das espécies vegetais inoculadas.

Ao serem submetidos a análise de regressão, os parâmetros nematológicos analisados (quantidade de massas de ovos, quantidade total de galhas, número total de nematoides por raiz, número de nematoides por grama de raiz e fator de reprodução) apresentaram um comportamento bastante semelhante, uma vez que há a redução dos mesmos conforme o aumento da dose (Figura 2 a, b, c, d e e, respectivamente).



**Figura 2** - Efeito das doses do formulado alecrim em hidrogel (g cova<sup>-1</sup>) nas variáveis nematológicas quantidade de massas de ovos (a), quantidade total de galhas (b), número total de nematoides por raiz (c), número de nematoides por grama de raiz (d) e fator de reprodução (e) em tomateiro inoculado com *M. incognita*, Análise de regressão a 5% de probabilidade.

Pode-se separar esses parâmetros em dois grupos, o primeiro refere-se a colonização e reprodução do nematoide, ao qual inclui número de galhas, número de massa de ovos e fator de reprodução, e um segundo grupo que diz

respeito a presença de ovos e juvenis de *M. incognita* nas raízes, com os fatores nematoides por raiz e nematoides por grama de raiz.

Apesar de no presente trabalho ambos os grupos apresentarem comportamentos semelhantes, em trabalhos como o de Mattei et al. (2014), testando doses do óleo essencial de alecrim no patossistema *Meloidogyne javanica* x soja, houve a redução dos parâmetros reprodutivos conforme o aumento da dose, porém, para os parâmetros de presença dos nematoides não houve diferença na aplicação do óleo essencial, nem mesmo para a testemunha. Os autores acreditam que esse comportamento se deve as doses baixas, onde aumentando as mesmas o efeito nematicida observado nas variáveis reprodutivas também seria observado na quantidade de nematoides presentes nas raízes.

No trabalho de Moreira et al. (2016), alguns fatores reprodutivos de *M. incognita* foram reduzidos no tomateiro com a aplicação de óleos essenciais de alecrim pimenta e capim citronela. Nesse trabalho foi possível observar redução de até 83% no número de galhas. Houve também redução no fator de reprodução, porém, o número de massa de ovos não sofreu alteração quando comparado a testemunha, o que provavelmente ocorreu, segundo os autores, em função da forma de obtenção dessa variável, a qual é feita por meio de uma escala de notas.

No trabalho de Coltro-Roncato et al. (2016) foram avaliados os mesmos parâmetros nematológicos no controle de *M. incognita* em tomateiro com extrato de crambe em diferentes formas de aplicação. As variáveis analisadas foram reduzidas com a aplicação do extrato e a melhor forma de aplicação encontrada foi via solo, a mesma utilizada no presente trabalho. Os autores atribuíram o controle obtido no contato direto, com os danos que alguns extratos de plantas podem ocasionar na cutícula externa do nematoide, além da ação de inibição da enzima V-ATPase, que tem efeito nematostático e nematicida, o que concorda com os resultados do experimento *in vitro* deste trabalho.

No trabalho de Swarowsky et al. (2014) o tratamento homeopático teve efeito sobre *M. incognita*, onde reduziu a oviposição e a eclosão dos J2, resultando em uma diminuição no número de juvenis em todas as doses testadas. Segundo os autores, a inibição da eclosão pode ser devido à redução da produção dos exsudatos radiculares que atuam como um estímulo para a

eclosão dos nematoides, além de um provável efeito na planta tratada para produção de enzimas que podem degradar a superfície dos ovos e a cutícula dos J2, como enzimas lipolíticas, proteases e quitinases.

Diferentes extratos vegetais podem mostrar efeito nematicida, porém é difícil determinar qual componente causa esse resultado, uma vez que há um grande efeito de interação entre o extrato utilizado, a planta hospedeira e o nematoide a ser controlado. O componente do alecrim já reconhecido como nematicida é o ácido rosmarínico (SILVA, 2011).

A ação nematicida do ácido rosmarínico já foi comprovada em alguns trabalhos, tais como o de Cooper, Jia e Goggin (2005), que encontraram respostas sistêmicas de plantas de tomate após serem pulverizadas com solução de ácido rosmarínico e jasmônico em concentrações de 1,5 mmol L<sup>-1</sup>, diminuindo drasticamente a população de *M. incognita*.

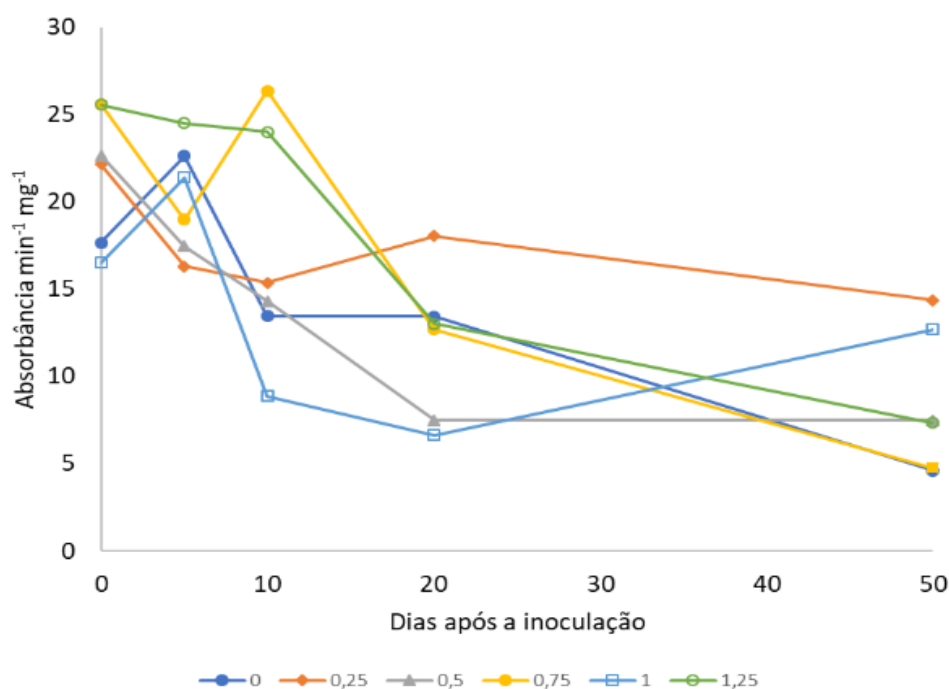
Como já comentado, os principais ativos existentes em óleos essenciais e extratos de plantas podem atuar diretamente sobre a cutícula do nematoide, alterando a sua permeabilidade, dentre outros efeitos diretos que podem exercer ao serem aplicados, mas também pode ocorrer a ativação de mecanismos de defesa da planta. A presença e composição desses extratos podem promover liberação a ativação de diferentes mecanismos envolvidos na defesa vegetal, via exsudação das raízes, que podem resultar em modificações enzimáticas na planta ou alterações fisiológicas, as quais irão prejudicar o ciclo de vida do nematoide nas plantas (LOPES et al., 2005; SCHWAN-ESTRADA; STANGALIN; CRUZ, 2003).

#### 4.2.3 Análises bioquímicas

Afim de verificar a possível ativação de mecanismos de defesa vegetal pela aplicação do formulado alecrim em hidrogel, foram medidas a atividade de três enzimas em função do tempo (dias após inoculação (DAI)), sendo elas a fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PFO), cujos resultados podem ser observados nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente. É importante ressaltar que o dia considerado como 0 (zero) é o momento da inoculação, porém, a mesma ocorreu 3 dias após a aplicação dos tratamentos

no solo no momento do transplante, justificando assim o porquê de algumas enzimas já apresentarem valores de atividade altos no dia 0.

Como é possível observar na Figura 3, em nenhum momento medido houve diferença estatística na atividade de FAL que diferenciase os tratamentos.



**Figura 3** – Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses (g cova<sup>-1</sup>) do formulado hidrogel em alecrim ocorreu três antes da inoculação. Não houve diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação.

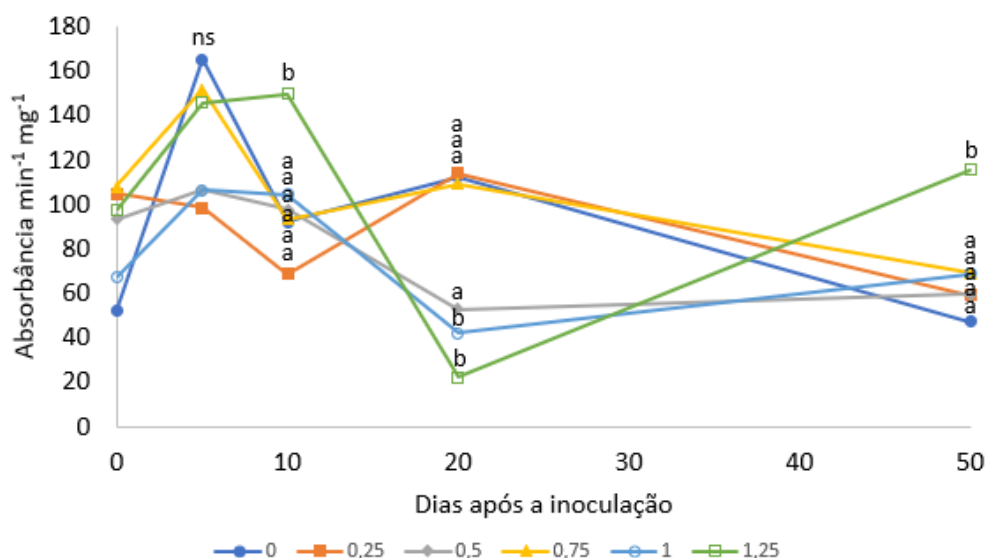
Assim também ocorreu no trabalho de Kuhn (2007), onde a atividade de FAL não foi alterada pela aplicação de acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus* em plantas de feijão contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, mesmo o primeiro sendo conhecido como um indutor de resistência já consolidado.

No trabalho de Formentini (2012) a FAL também não apresentou atividade na avaliação de indução de resistência utilizando extrato de alecrim em plantas de tomate, porém o autor contra-argumenta que é possível a planta apresentar FAL constitutiva armazenada, e que com isso a rota dos fenilpropanóides pode ter sido ativada, o que resulta na produção de compostos fenólicos, sendo que sabe-se que a FAL é precursora dessa rota, a qual pode produzir diversos

compostos como ácido benzóico, cumarinas, antocianinas, ácido caféico, precursores de lignina, entre outros.

Segundo Pascholati e Dalio (2018), o ácido clorogênico, que é um composto fenólico caracterizado como um éster de ácido caféico e ácido quínico, é um dos compostos encontrados nas plantas de alecrim e que também faz parte das raízes do tomateiro. É possível que após a infecção por nematoides esse composto seja oxidado pelas polifenoloxidasas, produzindo quinonas tóxicas que possivelmente tenham ação no controle dos nematoides.

Para a peroxidase pode-se observar atividade da dose de 1,25 aos 10 dias após a inoculação. Já aos 20 DAI estatisticamente os tratamentos 0, 0,25 e 0,75 foram relevantes. Aos 50 DAI o tratamento 1,25 volta a se destacar dos demais. Apesar do que é observado aos 20 DAI, os dados de 10 e 50 dias são bastante consistentes, mostrando uma atividade dessa enzima na dose mais alta do formulado.



**Figura 4** – Atividade da enzima peroxidase em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses (g cova<sup>-1</sup>) do formulado hidrogel em alecrim ocorreu três antes da inoculação. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Os resultados apresentados por Formentini (2012) são semelhantes ao do presente trabalho, onde há a atividade da enzima peroxidase pela aplicação dos tratamentos *Bacillus cereus*, extratos de alecrim e de cúrcuma quando

comparados à testemunha positiva (acibenzolar-S-metil) e à testemunha absoluta (água). Além disso os tratamentos testados também promoveram resultados eficientes nas variáveis nematológicas no controle de *M. incognita*, assim como neste trabalho.

A atividade de peroxidase está relacionada com a lignificação, por catalisar a oxidação de álcoois fenólicos neste processo, o que resulta em mudanças na parede celular, proporcionando maior resistência contra toxinas patogênicas (CARVALHO, 2012).

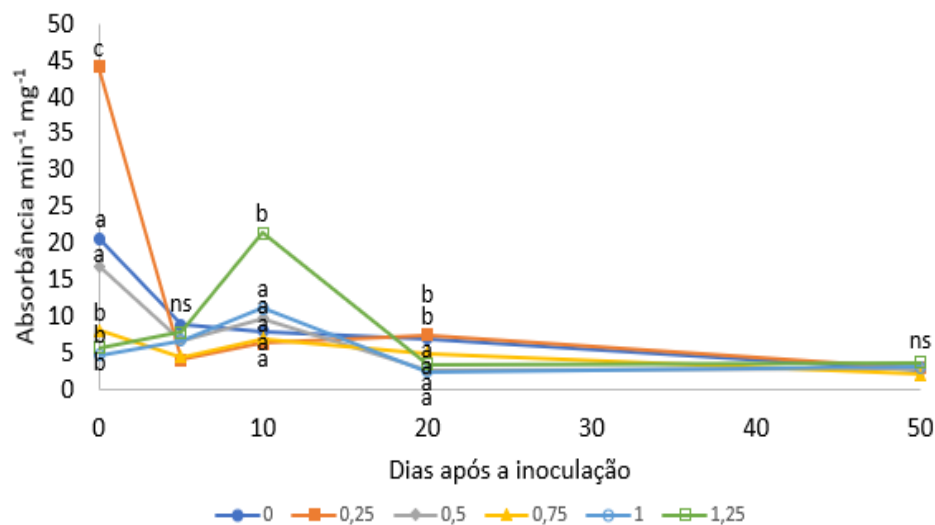
Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Lorenzetti et al. (2018), onde ocorre um aumento na atividade dessa enzima após o tratamento com extrato de alecrim em soja e inoculação do fungo *Macrophomina phaseolina*. Como no presente trabalho, os autores encontraram dois picos de atividade para uma mesma dose, ambos após o início do processo infeccioso.

Segundo Portz et al. (2011), o qual explica esse comportamento utilizando o exemplo do etileno, no geral o segundo pico é menos elevado que o primeiro e se dá devido ao processo de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, momento em que vários mecanismos de defesa se expressam de maneira mais acentuada. No caso desse trabalho, aos 50 dias é o momento em que *M. incognita* termina seu primeiro ciclo de vida e inicia o segundo, ou seja, é quando os J2 estão retornando para as raízes em sua forma infectiva, para uma nova colonização.

Como se pode observar na Figura 5, a polifenoloxidase (PFO) também mostrou atividade, porém esta se concentrou nos primeiros 20 DAI, onde se destaca o tratamento 0,25 g cova<sup>-1</sup> no tempo 0 e o tratamento 1,25 g cova<sup>-1</sup> aos 10 DAI. Aos 20 DAI, apesar de visualmente os resultados serem bastante próximos, estatisticamente os tratamentos 0 e 0,25 g cova<sup>-1</sup> diferem dos demais.

Segundo Bonaldo et al. (2005), quando a planta reconhece uma molécula eliciadora, rapidamente ela consegue se proteger do patógeno com maior eficiência. Porém, neste estudo é possível perceber que existe um pico do tratamento de 0,25 g do formulado já no momento da inoculação, o que pode ser prejudicial para a planta no sentido de gasto, pois mesmo conseguindo retardar o processo infeccioso ou mesmo impedi-lo, em alguns casos o gasto metabólico envolvido faz com que a indução não seja vantajosa, pois pode resultar em perdas de produção, por exemplo.





**Figura 5** - Atividade da enzima polifenoloxidase em função do tempo após a inoculação de tomateiro com *Meloidogyne incognita*. O tratamento das plantas com doses (g cova<sup>-1</sup>) do formulado alecrim em hidrogel ocorreu três antes da inoculação. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada tempo não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns: não significativo.

Como ocorreu na peroxidase, no trabalho de Formentini (2012) também houve resposta para a PFO após a aplicação do extrato de alecrim, porém o autor testou em seu trabalho cultivares suscetíveis e resistentes a *M. incognita*, onde a resposta da cultivar resistente foi mais pronunciada, o que foi atribuído aos níveis constitutivos da enzima encontrados em plantas de genótipo resistente. Isso é o contrário do que foi relatado no trabalho de Kuhn (2007), onde os indutores, tanto abiótico (acibenzolar-S-metil), quanto biótico (*B. cereus*) não mostraram alteração na ação da PFO em feijoeiro, ou seja, essa rota não sofreu alteração pela ação dos indutores.

Já Viecelli et al. (2009) encontraram alteração de concentração para polifenoloxidase após tratamento com *Pycnoporus sanguineus*, onde a atividade enzimática também se concentrou nos primeiros dias após a aplicação do tratamento indutor. Essa concentração inicial é explicada pela ação dessa enzima contra fitopatógenos, a qual ocorre logo após a penetração, quando a enzima é liberada dos tilacóides, após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, quando ocorre a oxidação dos compostos fenólicos

que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas que possuem ação antimicrobiana (LIU et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Segundo Portz et al. (2011), a atividade das enzimas, hora alta, hora baixa, é explicada como a resposta que a planta ocasiona em função do processo infeccioso, ou seja, quando a mesma julga necessário, aumenta os níveis dessas proteínas, porém, afim de poupar energia, em outros momentos a sua produção é diminuída. Este fato reforça a ideia de que houve a indução de resistência através da aplicação do formulado alecrim em hidrogel no patossistema estudado.

## 5 CONCLUSÕES

Conclui-se que há o efeito de toxicidade direta do extrato de alecrim sobre juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, chegando a mortalidade de 100% mesmo em doses baixas.

O formulado alecrim em hidrogel foi eficiente para o controle de *M. incognita* havendo uma redução proporcional ao aumento da dose em todas as variáveis testadas.

Devido a atividade encontrada nas enzimas peroxidase e polifenoloxidase nas avaliações realizadas durante o período, é possível concluir que a aplicação do formulado alecrim em hidrogel tenha ativado mecanismos de defesa vegetal no tomateiro contra a infecção de *M. incognita*.

## 6 REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. In: PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds). **Root-knot Nematodes**. Cambridge, MA - CABI International, p. 163-181, 2009.

ADAPAR, Agência de defesa e agropecuária do Paraná. **Agrotóxicos no Paraná: faça sua pesquisa. 2019.** Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>>. Acesso em: 21 dezembro 2019.

ALTINIER, G. et al. Characterization of topical 114 anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington – EUA, v. 55, p. 1718-1723, 2007.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2008, 391 p.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA - Relatório de Atividades de 2011/2012**. Brasília, p. 44, 2013. Disponível em: [www.portalanvisa.gov.br](http://www.portalanvisa.gov.br). Acesso em: 22 jan. 2020.

BABU, R. O. et al. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against Glutathione-S-Transferase of *Meloidogyne incognita*. **Bioinformation**. Singapore, v. 8, n. 7, p. 319-325, 2012.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië**. Bamberg, v. 57, p. 131-137, 1917.

BARCALA, et al. Belowground defence strategies against sedentary nematodes. **Signaling and communication in plants**. Cham - Switzerland, p. 221–251, 2016.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, p.62-74, 1986.

BERGAMIN-FILHO A.; AMORIM, L. Manejo integrado de doenças. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. cap. 20, p. 303-309.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: LARA, F. M. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, cap. 1, p. 11- 28.

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**. London, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO L.; MELO M. **A produção mundial e brasileira de tomate.** Dieese. Goiás, 19p. Disponível em: <https://www.dieese.org.br/projetos/estudoSobreAproducaoDeTomateIndustrialNoBrasil.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2020.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos.** 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. cap. 6, p. 85-92.

CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.** Passo Fundo, v. 7, p. 1379-1390, 2012.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galha para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira.** Brasília, v. 25, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. **Homeopatia - Princípios e Aplicações na Agroecologia.** Londrina - IAPAR, p.234, 2011.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos.** Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 2, p. 81-124.

CHARCHAR, J. M. et al. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 1 e **Agropecuária Brasileira.** Brasília, v. 40, n. 10, p. 989-995, 2005.

COELHO, R. G. et al. Desenvolvimento e características produtivas de tomate do tipo cereja em diferentes compostos orgânicos. **Revista Espacios.** Caracas, v. 39, n. 26, 2018.

COLLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue.** State Nematology and Entomology Research Station. Ohio, p. 77, 1972.

COLTRO-RONCATO, S. et al. Nematicidal effect of *Crambe abyssinica* leaf extracts to *Meloidogyne javanica* on tomato. **African Journal of Agricultural Research.** Nigeria, n. 11, v. 32, p. 3004-3011, 2016.

COLTRO-RONCATO, S. et al. Controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro pelo extrato de crambe em diferentes formas de aplicação. **Summa Phytopathologica.** Botucatu - SP, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2018.

COOK, R. J. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture.** Cambridge, v. 3, p. 51–6, 1988.

COOPER, W. R.; JIA L.; GOGGIN L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**. New Castle, v. 31, p. 1953-1967, 2005.

DALMARCO, J. B. **Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L.** 2012. 131 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

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

ESCOBAR, C. et al. Overview of root-knot nematodes and giant cells. **Advances in Botanical Research**. London, v.23 p. 1–32, 2015.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. cap. 13, p. 195-211.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; L. G. FREITAS. Sintomas causados por fitonematoides. In: ZAMBOLIN, L., W. C. JESUS Jr. & O. L. PEREIRA (ed.). **O essencial da fitopatologia**. Viçosa: Suprema, p. 203-222, 2012.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, UFV, p. 46-81, 2000.

FAO, food and agricultural organization. **FAO Statistical Yearbook**. Nova York, 2019. Disponível em: [www.fao.com](http://www.fao.com). Acesso em: 22 jan. 2019.

FORMENTINI, H. M. **Avaliação de indutores de resistência bióticos, abióticos e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. 2012. 93 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.

FREITAS, M. A. et al. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**. Florida, v. 45, p. 115-122, 2012.

HAMMERSCHMIDT, T.R. et al. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v.20, p.73-82, 1982.

HARVEY, M.; QUILLEY, S.; BEYNON, H. **Exploring the tomato: transformations of nature, society and economy**. Cheltenham: Edward Elgar, p. 324-340, 2002.

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**. Lion, v. 16, n. 2, p. 12, 2012.

HOLBEIN, J.; GRUNDLER, F. M. W.; SIDDIQUE, S. Plant basal resistance to nematodes: an update. **Journal of Experimental Botany**. Oxônia – UK, v. 67, n. 7, p. 2049–2061, 2016.

IBRAHIM, S. K.; TRABOULSI, A. F.; EL-HAJ, S. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. **Phytopathologia Mediterranea**. Florença, v. 45, n. 3, p. 238-246, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola estatística da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível [www.ibiblioteca.ibge.gov.br](http://www.ibiblioteca.ibge.gov.br). Acesso em: 23 jan. 2019.

INOUE-NAGATA, A. K. et al. Doenças do tomateiro. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia, volume 2: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2016. cap. 70, p. 697-732.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; DE QUEIROZ, S. C. D. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996–1012, 2009.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 139 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

LIMA, F. S. O. et al. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for affecting their management nematodes soybean and sustainable practices for their management. In: KASAI, M. (Ed.). **Soybean: The Basis of Yield, Biomass and Productivity**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech Open, p. 95-110, 2016.

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

LIU, Q. L.; THOMAS, V. P.; WILLIAMSON, V. M. Meiotic parthenogenesis in a root-knot nematode results in rapid genomic homozygosity. **Genetics**. Rockville – MD, v. 176, n. July, p. 1483–1490, 2007.

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido**. Brasília – DF. Circular técnica - Embrapa, ed. 2, 2011, 24 p.

LOPES, E. A. et al. Efeito dos extratos aquosos de Mucuna preta e de Manjeriçã sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**. Brasília, v. 29, n. 1, p. 67-74, 2005

LORENZETTI, E. et al. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LORENZETTI, E. et al. Controle de podridão cinzenta da haste em soja por extrato de alecrim. In: **CONGRESSO TÉCNICO CIENTÍFICO DA ENGENHARIA E DA AGRONOMIA**, 2016, Foz do Iguaçu. Resumo.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no brasil: nativas e exóticas cultivadas**: Nova Odessa. Instituto Plantarum, ed. 1, 2006, p. 512.

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

MAFESSONI, A. B. et al. Fungos antagonistas e suas combinações contra *Meloidogyne* spp. em solo de cultivo de tomate sem a presença de hospedeiro. **Acta Biológica Catarinense**. Santa Catarina, v. 6, n. 3, p. 54-60, 2019.

MAIA, A. J. et al. Óleo 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, 2014.

MARAHATTA S. P. et al. Effects of *Tagetes patula* on active and inactive stages of root-knot nematodes. **Journal of Nematology**. Hanover, v. 44, p. 26-30, 2012.

MARTINS, E. S. C. S. et al. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle in vitro de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**. João Pessoa, v. 4, n. 1, p. 9-13, 2010.

MARTINS, M. C. B.; SANTOS, C. D. G. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agrônômica**. Fortaleza, v. 47, n. 1, p.62-78. 2016.

MATTEI, D. **Alterações bioquímica e física da soja tratada com silicato de potássio visando o controle de *Meloidogyne incognita***. 2018. 116 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2018.

MATTEI, D. et al. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* in the control of *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 469-476, 2014.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de Pitangueira. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, 2008.

MELO, T. A. de et al. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 38, n. 3, p. 223–227, 2012.

MINAMI, K.; MELLO, S. C. **Fisiologia e nutrição do tomateiro**. Curitiba: Senar Ar/PR, 2017, p. 1185 p.



MIORANZA, T. M. et al. Potencial nematicida e nematostático do extrato de *Curcuma longa* sobre *Meloidogyne incognita*. **Revista de Ciências Agroambientais**. Alta Floresta - MT, v. 14, n. 1, p. 104-109, 2016.

MOREIRA, F. J. C. M. et al. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2, com óleos essenciais em solo. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 41, n. 3, p. 207-213, 2015.

MOREIRA F. J. C. SANTOS, C. D. G., INNECCO, R. Eclosão e mortalidade de juvenis J2 de *Meloidogyne incognita* raça 2 em óleos essenciais. **Revista Ciência Agrônômica**. Fortaleza, v. 40, n.3, p. 441-448, 2009.

MULLER, M. A. et al. Mortalidade e motilidade de *Meloidogyne incognita* em extrato aquoso de alecrim. **Scientia Agraria Paranaensis**. Marechal Cândido Rondon, v. 13, p. 343-346, 2014.

NAIKA, S. et al. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Wageningen: **Fundação Agromisa e CTA**. Rob Barnhoorn (Trad.). ed. 1, 2006, 104 p.

NARAYANASAMY, P. **Biological management of diseases of crops**, vol. 2: Integration of Biological Control Strategies with Crop Disease Management **Systems Springer**. Netherlands - Dordrecht, v.2, cap. 1, p. 1-7, 2013.

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

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela Aplicação da Tecnologia do Código de Barras do DNA. **Nematologia Brasileira**. Brasília, v. 33, p. 218-243, 2009.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematode and plants. **Mededelingen Landbouhogeschool**. Wageningen, v. 66, n. 04, p. 3-46, 1966.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia, volume 2: princípios e Conceito**. 5. ed. Ouro Fino: Agrônômica Ceres Ltda, 2018. cap. 35, p. 424-450.

PINHEIRO, J. B. **Nematoides em hortaliças**. Brasília: Embrapa, 2017.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA R. B.; SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Embrapa Hortaliças – Circular técnica. Brasília – DF, 2014.

PINHEIRO, J. B. et al. Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil. **Embrapa Hortaliças – Circular técnica**. Brasília – DF, 2014.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 19, n. 2, 2001.

PORTZ, R. L. et al. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. **Forest Pathology**. London, v. 41, p. 202-211, 2011.

QUINTELA, M. P. et al. Intensity and duration of water deficit on the pathosystem sugarcane x *Meloidogyne incognita*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 19, n. 6, p. 22-30, 2015.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de Fitopatologia, volume 1: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. cap. 3, p. 27-43.

RODRIGUES, M. C. et al. **Influência do extrato de alecrim no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos**. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 1., 2010, Bagé. Salão Internacional De Ensino, Pesquisa e Extensão. Bagé - Anais: Universidade Federal do Pampa, 2010. Disponível em: <http://200.132.146.161/index.php/siepe/article/view/4704>. Acesso em: 02 fev. 2020.

SANKAR, C. et al. Induction of resistant to *Radopholus similis* and defence related mechanism in susceptible and resistance banana hybrids infected with *Radopholus similis*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. Raipur, v. 6, n. 4, p. 1668–1684, 2017.

SANTOS, T. F. S. **Metodologia de avaliação a *Pratylenchus brachyurus* e relação de genótipos de soja aos nematoides das galhas e lesões**. 2012. 82 p. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Mato Grosso, Rondonópolis, 2012.

SAS Institute Inc., **SAS University Edition: Instalation guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2014.

SCHONS, B. C.; STANGARLIN, J. R. Controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro com formulado alecrim em hidrogel. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.]. Dourados, v. 11, n. 2, dec. 2016.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. Mesa Redonda do XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**: Uberlândia, v. 28, p. 554-556, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. et al. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F. et al. **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba, p. 227-248, 2008.

SILVA, W. J. R. **Substâncias orgânicas no controle de *Meloidogyne* spp. em raízes de plantas**. 2011. 114 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOARES, P. L. M. et al. Controle biológico de nematoides. In: BALDIN, E. L. L.; KRONKA, A. Z.; SILVA I. F. **Inovações em manejo fitossanitário**. Botucatu: EPAF, cap. 11, 2017, p. 167-232.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. Marechal Cândido Rondon, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

SWAROWSKY, R. A. et al. Influence of high dilutions of *Cina* for the control of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. **American Journal of Plant Sciences**. Connecticut, v. 5, n. 25, 6 p., 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematode (*Meloidogyne* species)**. Raleigh, NC: Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology. Carolina do Norte, p. 1978-111, 1978.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. A medicina do futuro. In: **Herbarium: compêndio de fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p. 372, 1993.

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, 2006.

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

VERMA, J. P. et al. Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. **Ecological Engineering**. Prague - CR, v. 51, p. 282–286, 2013.

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 24, n. 2, p. 87-96, 2009.

VILELA, N. J. et al. **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília – DF: Embrapa hortaliças, 2012, 18 p.

WANG, J.; et al. Rosmarinic acid from eelgrass shows nematicidal and antibacterial activities against pine wood nematode and its carrying bacteria. **Marine Drugs**. Basel, v. 10, n. 2, p. 2729-2740, 2012.

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**. California, v. 8, n. 10, p. 1735-1744, 1996.

ZEILINGER, S. et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS Microbiology Reviews**. Oxford, v. 40, p. 182–207, 2015.

ZHOU, D. et al. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. **Plant and Soil**. London, v. 401, p. 259-272, 2015.