

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÁLVARO RODRIGO FREDDO

**POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO
TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO, PEPINO E
BETERRABA**

TESE

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

ÁLVARO RODRIGO FREDDO

**POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO
TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO, PEPINO E
BETERRABA**

TESE

PATO BRANCO

2015

ÁLVARO RODRIGO FREDDO

**POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE
FITOPATÓGENOS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO
TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO, PEPINO E
BETERRABA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Co-Orientadores: Prof. Dr. Cleverson Busso e

Profª. Dra. Maristela dos Santos Rey Borin

PATO BRANCO

2015

Dados Internacionais de Catalogação

<p>F852p Freddo, Álvaro Rodrigo Potencial do óleo de <i>Aloysia citriodora</i> Palau no controle de fitopatógenos e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijão, pepino e beterraba / Álvaro Rodrigo Freddo. – 2015. 124 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro Co-orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso Co-orientador: Profa. Dra. Maristela dos Santos Rey Borin Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, 2015. Inclui Bibliografia.</p> <p>1. Agronomia 2. Pragas agrícolas – controle I. Mazaro, Sergio Miguel, orient. II. Busso, Cleverson, co-orient. III. Borin, Maristela dos Santos Rey, Co-orient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 22. ed.: 630</p>

Ficha Catalográfica elaborada por: Leandro Pandini, 2015.

CRB – 9/1473



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese n.º 004


Potencial do óleo de *Aloysia citriodora* Palau no controle de fitopatógenos e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijão, pepino e beterraba


por


Álvaro Rodrigo Freddo

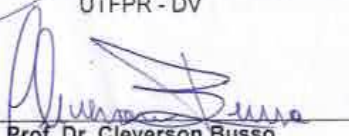
Tese apresentada às nove horas do dia dezoito de setembro de dois mil e quinze, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Indução de Resistência, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Indução de Resistência), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Gilmar Franzener
UFFS – Laranjeiras do Sul

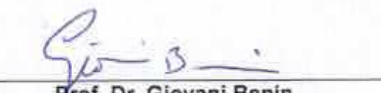

Prof. Dr. Maristela Dos Santos Rey Borin
UTFPR - DV


Prof. Dr. Jean Carlo Possenti
UTFPR - DV


Prof. Dr. Cleverson Busso
UTFPR - DV


Prof. Sérgio Miguel Mazaro
Orientador

Visto da Coordenação:


Prof. Dr. Giovani Benin
Coordenador do PPGAG

À minha esposa Dayane e à minha filha Rafaela,
as pessoas mais importantes da minha vida. Faço
tudo por vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo dom da vida, pelas graças que recebo de suas mãos todos os dias;

Agradeço à minha esposa Dayane por estar todos os dias ao meu lado, me dando forças, pela filha que me deu, pelo amor que cada dia mais aumenta entre nós;

Agradeço à minha filha Rafaela, pelo seu sorriso e sua alegria de conhecer o mundo, que a cada dia me faz olhar as coisas de maneira diferente, que ao nascer mudou toda a minha vida, me deu a alegria incomparável e o dom sagrado de ser pai;

Agradeço aos meus pais, Arthur e Salete, que sempre me incentivaram a estudar, fizeram tudo para que eu chegasse até aqui. Minha mãe que me ensinou a cortar as letrinhas das revistas e juntá-las para descobrir as primeiras palavras, que nunca me deixou brincar sem antes fazer as tarefas da aula, nesse pequeno gesto me ensinou o valor do estudo, para que eu chegasse até aqui;

Agradeço aos meus irmãos, Ademir e Ana, sempre companheiros e prontos para me ajudar. Meu irmão que sempre me ajudou, me buscando na aula em dias de chuva, arrumando apostilas para o vestibular, seus conselhos foram muito importantes no curso que escolhi. Minha irmã que dividiu casa comigo na faculdade, período que aumentou nosso companheirismo;

Agradeço aos meus sobrinhos, Matheus, Eduardo e Guilherme;

Agradeço à todos familiares que sempre me incentivaram, em especial ao meu finado avó Quintilio Giongo, que em minha infância me aconselhou a trilhar pelo caminho do estudo;

Agradeço à família de minha esposa, a seus pais Airto e Helena, que hoje também são meus pais, às minhas cunhadas Natasha e Bruna, e ao seu tio e meu grande amigo desde a infância Alcemar;

Agradeço ao meu orientador Sérgio, que não é apenas um grande orientador, más um grande professor, pesquisador, profissional, visionário e principalmente um grande amigo;

Agradeço aos meus co-orientadores Cleverson e Maristela pelas orientações e conselhos;

Agradeço a todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Agronomia;

Um agradecimento em especial ao meu grande colega e amigo Flávio Cechim, um cara extraordinário, que foi meu grande companheiro de viagens para as aulas, me ajudou nos meus trabalhos de laboratório, e acima de tudo, amigo de verdade;

Agradeço aos alunos de graduação em agronomia que me auxiliaram nos trabalhos de laboratório da minha tese, Nean Locatelli Dalacosta, Adriano Lewandoski e um agradecimento em especial ao aluno Ivan Carlos Zorzi, que não apenas me auxiliou, fez o trabalho inteiro comigo;

Agradeço ao técnico de laboratório Juliano e à professora Dalva Paulus pelo auxílio no Campus Dois Vizinhos e também ao professor Jean Possenti do Laboratório de Sementes.

Agradeço aos meus colegas de trabalho e à instituição a que pertenço, UNISEP, pelo apoio neste período, em especial a coordenadora do curso de Agronomia, Claudia Manteli.

Agradeço ao Governo Federal e em especial à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de realização de minha pós-graduação, de forma gratuita e de qualidade;

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram, incentivaram e torceram para que eu chegasse até aqui, daria para escrever várias páginas, enfim muito obrigado de coração!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

FREDDO, Álvaro R. POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO, PEPINO E BETERRABA. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

Os cultivos agrícolas são acometidos por pragas e doenças que diminuem sua produtividade. Dentre as doenças está o tombamento de plântulas que pode ocorrer em pré e pós-emergência. Nas culturas de feijão, pepino e beterraba o tombamento é ocasionado por diversos patógenos, mas principalmente por fungos fitopatogênicos. Várias medidas são utilizadas para o controle deste tipo de doenças e dentre estas, está o tratamento de sementes com fungicidas químicos. No entanto, a sociedade tem cada vez mais se preocupado com a qualidade dos alimentos e com a contaminação ambiental, gerando uma busca por produtos menos agressivos ao homem e ao ambiente. O uso de óleos essenciais para o controle de fitopatógenos é um exemplo de alternativa testada pela ciência, na busca de tecnologias menos agressivas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do óleo de *Aloysia citriodora* no controle de fitopatógenos e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijão, pepino e beterraba. Esta tese foi dividida em quatro capítulos, sendo o primeiro introdutório e os demais abordando o patossistema *Pythium* sp. em feijoeiro, *Sclerotinia sclerotiorum* em pepino e *Fusarium* sp. em beterraba. A metodologia utilizada consistiu na realização de quatro experimentos em cada patossistema, sendo o trabalho todo realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. No primeiro experimento avaliou-se o efeito fungistático e fungicida do óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA *in vitro*, no crescimento micelial dos patógenos estudados. No segundo experimento avaliou-se o efeito *in vitro* de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, em meio BD em lâminas de microscopia, na germinação de esporângios de *Pythium* sp. e de conídios de *Fusarium* sp. e em placas de Petri com meio BDA, no índice de velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*. No terceiro experimento, avaliou-se por meio de teste de germinação em rolo de papel (RP), o efeito do uso de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* no tratamento de sementes de feijão, pepino e beterraba. As variáveis utilizadas para avaliar este experimento foram a porcentagem de germinação, vigor, massa verde média por plântula e comprimento médio de plântulas. No quarto experimento avaliou-se o efeito do tratamento de sementes de feijão, pepino e beterraba, com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, semeadas em substratos contaminados com seus subseqüentes patógenos estudados, *Pythium* sp., *S. sclerotiorum* e *Fusarium* sp. Neste experimento, utilizaram-se as seguintes variáveis: porcentagem de emergência, porcentagem de tombamentos de plântulas de pós-emergência, massa verde média por plântula, comprimento médio por plântula e análises bioquímicas. As análises bioquímicas dos tecidos vegetais avaliados foram as seguintes: teor de proteínas, atividade enzimática de peroxidases, fenilalanina amônia-liase (FAL), quitinases e β -1,3-glucanases. Os resultados obtidos *in vitro*, demonstram que o óleo essencial possui efeito fungistático e fungicida no crescimento micelial e na germinação de esporângios, conídios e escleródios dos patógenos estudados no presente trabalho, o que pode estar relacionado aos seus principais componentes, citral e limoneno. O óleo também apresenta baixa fitotoxidez às sementes das espécies estudadas, em feijão diminuiu apenas a germinação na maior dosagem estudada (0,25%), em pepino também na maior dosagem (0,25%) reduziu o comprimento de plântulas e em beterraba não houveram efeitos negativos às plântulas. No experimento em

substrato contaminado com os patógenos, o uso de óleo essencial: aumentou a germinação e diminuiu os tombamentos de plântulas de feijoeiro; na concentração de 0,0625% diminuiu os tombamentos de pós-emergência em pepino. Nas análises bioquímicas constatou-se aumento da atividade enzimática de peroxidases e β -1,3-glucanases em feijoeiro, aumentou a atividade enzimática de peroxidases e glucanases em pepino e aumentou a atividade enzimática de peroxidases em beterraba, demonstrando dessa forma ação do óleo na indução de resistência ao tombamento de plântulas.

Palavras-chave: defesa vegetal; controle alternativo; peroxidases; fenilalanina amônia-liase; β -1,3-glucanases; quitinases; *Phaseolus vulgaris* L.; *Cucumis sativus* L.; *Beta vulgaris* L.

ABSTRACT

FREDDO, Álvaro R. POTENTIAL OF *Aloysia citriodora* Palau oil ON THE PHYTOPATHOGENS AND IN THERESISTANCE INDUCTION AT DAMPING OFF IN BEAN, CUCUMBER AND BEET. 124p. Thesis (Doctor in Agronomy) – Pós-graduate in Agronomy Program (Concentration Area: Vegetal Production), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2015.

The crops are affected by pests and diseases that decrease productivity. Among them are the damping off of seedlings that can occur in pre and post-emergence. In bean crops, cucumber and beet these diseases occur, being caused by various pathogens, especially fitopathogenic fungi. Several measures are used for the controle of such diseases, among them, is the chemical seed treatment fungicides. However, society has become increasingly concerned about the quality and food and environmental contamination, generation a growing search for sensitive products to humans and the environment. The use of essential oils to control plant pathogens is an example of alternative tested by science in the search for less aggressive technologies. This study aimed to evaluate the efficiency of the use of essential oil *Aloysia citriodora*, in control of pathogens causing damping off in beans, cucumber and beet. This thesis was divided in four chapters, the introductory first, and the other addressing the control of *Pythium* sp. in beans, *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber, and *Fusarium* sp. on beet. The methodology consisted of four experiments in each pathosystem, with all the work done at the Federal Technological University of Parana, Campus Dois Vizinhos. In the first experiment evaluated the fungistatic and fungicidal effect of the essential oil of *A. citriodora* on PDA *in vitro* in mycelial growth of pathogens studied. In the second experiment evaluated the *in vitro* effect of essential oil concentrations of *A. citriodora* in BD medium on microscope slides, on the germination of sporangia *Pythium* sp. and conidia *Fusarium* sp., and in Petri dishes with PDA medium, the sclerotia germination speed index of *S. sclerotiorum*. In the third experiment, we evaluated in germination test in paper roll (PR), the phytotoxic effect or not the use of essential oil concentrations of *A. citriodora* in dry bean seed, cucumber and beet. The variables used to assess this experiment were the germination percentage, mediun green mass per plant and average length of seedlings. In the fourth experiment we assessed the effect of treating bean seeds, cucumber and beet with essential oil contents of *A. citriodora*, seeds in their subsequent substrates contaminated with pathogens studied, *Pythium* sp., *S. sclerotiorum* and *Fusarium* sp. In this experiment we used the following variables: percentage of emergence, percentage of post-emergence damping off, green average mass per plant, average length per plant and biochemical analyzes. The biochemistry of plant tissues evaluated were as follows: protein content, enzymatic activities of peroxidases, phenylalanine ammonia-liase (PAL), chitinases and β -1,3-glucanases. The *in vitro* results show that the essential oil has fungistatic and fungicidal effect on mycelial growth, on sporangia germination, conidia and sclerotia of the pathogens studied in this work, wich may be related to its major components, citral and limonene. The oil also exhibits low phytotoxicity to seeds of the species studied, only in beans decreases germination in most studied dosage (0,25%), cucumber also in the higher dosage (0,25%) reduce the length of seedlings, and beet there were no negative effects to the seedlings. In the test in substrate contaminated with the pathogens, the use of essential oil: increased germination and decreased post emergence damping off of beans seedlings; at a concentration of 0,0625% decreases post emergence

damping off in cucumber. In biochemical analyzes found an increase in the enzymatic activity of peroxidases and β -1,3-glucanases on beans, and glucanases on cucumber, and increased enzyme activity of peroxidases on beet, showing action in resistance induction at damping off.

Key words: vegetal deffense; alternative control; peroxidases; phenylalanine ammonia-lyase; β -1,3-glucanases; chitinases; *Phaseolus vulgaris* L.; *Cucumis sativus* L.; *Beta vulgaris* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Crescimento micelial de *Pythium* sp. em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, dez dias após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.....45
- Figura 2: Porcentagem de esporângios de *Pythium* sp. germinados, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, vinte e quatro horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro, Pato Branco, PR, 2015.....46
- Figura 3: Porcentagem de germinação de sementes de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....48
- Figura 4: Massa verde média por plântula de feijão cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 201549
- Figura 5: Porcentagem de emergência aos quatro e nove dias, de plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....50
- Figura 6: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....52
- Figura 7: Atividade enzimática de peroxidases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....53
- Figura 8: Atividade enzimática de β -1,3-glucanases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....54
- Figura 9: Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, 72 horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.....70
- Figura 10: Índice de velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA, oito dias após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro, Pato Branco, PR, 2015.....71
- Figura 11: Comprimento médio por plântula de sementes de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$, no escuro, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....73

- Figura 12: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....74
- Figura 13: Teor de proteínas dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....75
- Figura 14: Atividade enzimática de peroxidases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....76
- Figura 15: Atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....77
- Figura 16: Atividade enzimática de quitinases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....77
- Figura 17: Atividade enzimática de β-1,3-glucanases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....78
- Figura 18: Crescimento micelial de *Fusarium* sp. *in vitro*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, 96 horas após incubação em câmara de crescimento a 24°C±1°C e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.....94
- Figura 19: Porcentagem de germinação de conídios de *Fusarium* sp. *in vitro*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em lâminas de microscopia, contendo meio BD, 24 horas após incubação em câmara de crescimento a 24°C±1°C e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.....96
- Figura 20: Porcentagem de germinação de sementes de beterraba cv. Maravilha em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de 65%±10%, no escuro, Pato Branco, PR, 2015.....97
- Figura 21: Comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, quatorze dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de 65%±10%, no escuro, Pato Branco, PR, 2015.....98
- Figura 22: Porcentagem de emergência de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*,

postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ por quatorze dias, fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.....99

Figura 23: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....99

Figura 24: Atividade enzimática de peroxidases de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....100

Figura 25: Atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....102

Figura 26: Atividade enzimática de quitinases de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 70%±10% por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....49
- Tabela 2: Comprimento e massa verde de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a 25°C±2°C e umidade relativa de 65%±10% por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....51
- Tabela 3: Teores de proteínas totais, atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) e quitinases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a 25°C±2°C e umidade relativa de 65%±10%, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.....52
- Tabela 4: Porcentagem de germinação e massa verde média de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 70%±10%, no escuro, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....72
- Tabela 5: Porcentagem de emergência aos quatro e oito dias, massa verde média por plântula e comprimento de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato contaminado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.....73
- Tabela 6: Porcentagem de germinação aos quatro dias e massa verde média por plântula de beterraba cv. Maravilha, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 70%±10%, no escuro, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....97
- Tabela 7: Comprimento médio e massa verde média por plântula de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....100
- Tabela 8: Teor de proteínas e atividade enzimática de β-1,3-glucanases em plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.....101

LISTA DE SIGLAS

BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
cv.	Cultivar
CMI	Concentração mínima de inibição
CTSBF	Comissão Técnica Sul Brasileira de Feijão
Dr.	Doutor
DVPR	Dois Vizinhos Paraná
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAL	Fenilalanina amônia-liase
IVE	Índice de velocidade de emergência
IVG	Índice de velocidade de germinação
Ns	Não Significativo
NT-805	Nova Técnica – 805
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Unidade da Federação – Paraná
Proteínas-RP	Proteínas Relacionadas à patogenicidade
PVP	Polivinilpirrolidona
RAS	Regras de Análises de Sementes
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
Tris	Tri hidroximetil-aminometano
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetros
Conídios.mL ⁻¹	Conídios por mililitro
G	Gramas
g.Kg ⁻¹	Gramas por quilograma
L	Litro
M	Molar
Mg	Miligramas
mg.g ⁻¹	Miligramas por grama
mg.ml ⁻¹	Miligramas por Mililitro
min.	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimol
Mm	Milímetro
N	Normal
Nm	Nanômetro
RP	Rolo de Papel
RPM	Rotações por Minuto
UAbs. mg ⁻¹	Unidade de Absorbância por minuto por miligramas
Unidade enzimática. mg ⁻¹	Unidade enzimática por miligramas
Unidade enzimática. min ⁻¹	Unidade enzimática por minuto
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
μL	Microlitros
±	Mais ou menos
X	Veze

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS	18
2.2 FUNGOS CAUSADORES DE TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS E SUAS CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS	19
2.3 PATOSSISTEMAS ESTUDADOS	21
2.5 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	24
2.6 <i>Aloysia citriodora</i> Palau	26
2.7 REFERÊNCIAS	28
3. POTENCIAL DO ÓLEO DE <i>Aloysia citriodora</i> NO CONTROLE DE <i>Pythium</i> sp. <i>IN</i> <i>VITRO</i> E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEJJOEIRO COMUM	35
3.1 RESUMO	35
3.2 ABSTRACT	36
3.3 INTRODUÇÃO	37
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.6 CONCLUSÕES	55
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
4. POTENCIAL DO ÓLEO DE <i>Aloysia citriodora</i> Palau NO CONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>IN VITRO</i> E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE PEPINO.....	60
4.1 RESUMO	60
4.2 ABSTRACT	61
4.3 INTRODUÇÃO	62
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.6 CONCLUSÕES	79
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
5. POTENCIAL DO ÓLEO DE <i>Aloysia citriodora</i> Palau NO CONTROLE DE <i>Fusarium</i> sp. <i>IN VITRO</i> E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE BETERRABA.....	84
5.1 RESUMO	84
5.2 ABSTRACT	85

5.3 INTRODUÇÃO	86
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
5.6 CONCLUSÕES	103
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

As espécies agrônômicas feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), pepino (*Cucumis sativum* L.) e beterraba (*Beta vulgaris* L.) são de grande importância para a agricultura brasileira. Estas são cultivadas por diversos produtores, nas mais diversas regiões do país, sendo componentes importantes da agricultura familiar.

Estas culturas podem ter sua produtividade diminuída e em muitos casos até inviabilizada, por pragas e doenças que acometem os seus cultivos. Estas espécies estão sujeitas no início da sua germinação, até os primeiros dias após a emergência, a tombamentos de plântulas ou ‘damping-off’.

Os principais agentes patogênicos deste tipo de doenças, são principalmente fungos, como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. e *Cylindrocladium* spp. (BIANCHINI et al., 2005; ETHUR et al., 2005; CASTRO et al., 2007; BEDENDO, 2011; TIVELLI et al., 2011).

Dentre as várias medidas de controle destes tipos de doenças em campo, destacam-se principalmente: a rotação de culturas; a descompactação do solo para melhorar a aeração e diminuir assim o excesso de umidade nas camadas superficiais; a diminuição da densidade de plantio; e o uso de produtos químicos no tratamento de sementes e no tratamento de solo (BEDENDO, 2011).

A utilização de agroquímicos, pela sua maior eficiência, consitiu-se no método mais utilizado pelos agricultores, no entanto, têm diversos problemas inerentes, como os ambientais e toxicológicos, resistência de fungos a princípios ativos e não podem ser utilizados em sistemas de produção orgânicos.

Estes problemas têm requerido o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de doenças de plantas e também, a procura por novas moléculas mais eficientes e que não tenham problemas de resistência por parte dos agentes patogênicos e que também, tenham potencial para induzir mecanismos de resistência nos tecidos vegetais.

Os óleos essenciais de plantas consideradas medicinais, cada vez mais têm sido estudados e utilizados, com vistas ao controle de pragas e doenças de plantas, devido ao seu potencial fungitóxico e indução de mecanismos de resistência (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

O capim-cidró (*Aloysia citriodora* Palau), também conhecido como cidrão e erva-luiza, é uma planta medicinal, nativa da América do Sul, pertencente à família Verbenaceae. É cultivada no Brasil e em várias partes do mundo, possui propriedades medicinais, ligadas principalmente ao seu óleo essencial, que são utilizadas na medicina popular (LORENZI, 2008).

Diversos trabalhos mostram seu potencial de utilização contra agentes infecciosos na medicina humana, bem como suas propriedades antimicrobianas (OHNO et al., 2003; DUARTE et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010; ALI et al., 2011). Entretanto, na fitopatologia são escassos os trabalhos que relatem sua utilização.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do óleo de *Aloysia citriodora* no controle de fitopatógenos e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijão, pepino e beterraba.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS

Doenças radiculares são caracterizadas por uma diversidade de sintomas nas plantas, que podem ser podridões de sementes, tombamento de plântulas em pré ou pós-emergência, podridões radiculares, murchas vasculares, podridões moles e nematoses radiculares (MICHEREFF et al., 2005a). Dentre as doenças radiculares que afetam as plantas em sua fase inicial, destacam-se os tombamentos de plântulas, também denominados *damping off*.

Bedendo (2011), afirma que este tipo de enfermidade consiste num grupo de doenças causadas principalmente por fungos e cromistas, que afetam tecidos vegetais jovens, ainda dependentes ou recém-libertos das reservas nutricionais acumuladas na semente. O mesmo autor relata que este tipo de doença tem grande importância no estabelecimento da cultura no campo ou no viveiro, podendo reduzir a densidade desejável de plantio. Moorman e Gwinn (2010) citam que sementes e plântulas são mais suscetíveis a este tipo de doenças do que plantas mais maduras.

O tombamento de plântulas resulta do apodrecimento ainda na fase juvenil, onde os tecidos são invadidos logo após a germinação das sementes, por meio da ação de enzimas do patógeno, antes mesmo da penetração das estruturas somáticas do patógeno (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012a). Na região do caulículo, quase sempre no colo, observa-se manchas inicialmente encharcadas, que crescem rapidamente, tornando-se escuras, progredindo para lesões deprimidas, também de coloração escura. Estas lesões podem provocar fendilhamento ou constrição do caule, podendo desta forma, levar ao tombamento das plântulas em pré ou pós-emergência, quase sempre observado em reboleiras (BEDENDO, 2011).

Diversas condições induzem, bem como agravam o tombamento de plântulas. Michereff et al. (2005a) citam que a ocorrência de tempo úmido no período de maturação dos grãos, colheita e até mesmo no armazenamento, podem levar ao apodrecimento das sementes ou podridões pós plantio, por fungos causadores de *damping-off*.

Os patógenos causadores destes tipos de doenças são principalmente fungos de solo. Estes possuem em sua maioria, como condição agravante, a produção de estruturas de resistência (clamidósporos, microescleródios, oósporos e escleródios), que garantem a

sobrevivência até mesmo sem a presença dos seus hospedeiros, por vários anos (OWNLEY; BENSON, 2010).

A disseminação destes agentes patogênicos ocorre principalmente por água e equipamentos que transportam solos e restos de cultura infestados (BIANCHINI et al., 2005), pelo transporte de mudas e por sementes contaminadas (BEDENDO, 2011). No solo, algumas condições desfavorecem a planta e favorecem os patógenos causadores de *damping-off*. Dentre estas condições, a principal delas é a presença de alta umidade, pois solos encharcados são extremamente favoráveis à proliferação de *Pythium* e *Phytophthora*, como por exemplo (BEDENDO, 2011).

2.2 FUNGOS CAUSADORES DE TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS E SUAS CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS

As espécies pertencentes ao gênero *Pythium*, constituem-se em patógenos de solo, que causam doenças em plantas, conhecidas como tombamentos, que podem ocorrer em pré ou pós-emergência. Essas enfermidades se caracterizam por apodrecerem o sistema radicular e, ou, do coleto das plantas (PEREIRA; SOARES, 2012).

Este fungo é um oomiceto, ou seja, pertence ao Reino Chromista. O gênero *Pythium* é amplamente distribuído no mundo todo. Este fungo na ausência do hospedeiro sobrevive saprofiticamente em restos culturais, ou permanece dormente por meio de suas estruturas de resistência, os oósporos (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

Uma das condições que agravam este tipo de doença em feijoeiro, é a presença de excesso de umidade no solo (BIANCHINI et al., 2005). De acordo com Gould (2010), isto se deve ao fato de que os oomicetos são conhecidos como “mofos aquáticos”, pois grande parte das espécies deste grupo, possuem um estágio de esporo que nada (zoósporos biflagelados).

Michereff et al. (2005a) destacam além do feijão, as seguintes culturas nas quais espécies do gênero *Pythium* também podem causar *damping off*: alface, algodão, alho, cebola, berinjela, beterraba, cenoura, fumo, soja e em milho, a queima de plântulas.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é um ascomiceto que parasita diversos órgãos suculentos das plantas, principalmente de hortaliças e culturas anuais (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011). O patógeno tem como hospedeiras 75 famílias botânicas, 278 gêneros e 408 espécies de plantas, sendo em sua maioria dicotiledôneas (BOLLAND; HALL, 1994),

como exemplo: crucíferas, alface, amendoim, batata, berinjela, cenoura, cucurbitáceas, dália, feijoeiro, fumo, jiló, pimentão, pimentas, tomate, soja e algumas plantas daninhas (MARINGONI, 2005).

O fungo *S. sclerotiorum* pode causar tombamento de plântulas de pré e pós-emergência em pepineiro, quando cultivado em ambiente protegido (ETHUR et al., 2005) e em outras culturas em condições não protegidas, como por exemplo em feijoeiro (VIANA et al., 2000).

A sobrevivência deste fungo no solo se dá por escleródios e ou micélio em restos culturais (MICHEREFF et al., 2005a). Os escleródios garantem a sobrevivência do organismo por muitos anos no solo na ausência do seu hospedeiro (OWNLEY; BENSON, 2010), que no caso de *S. sclerotiorum* pode perdurar por seis a oito anos (BIANCHINI et al., 2005).

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica por hifas (ETHUR et al., 2005), ou então, de forma carpogênica, produzindo apotécios pedicelados. Nos apotécios são formados ascos contendo ascósporos, que são projetados e disseminados pelo vento para infectar as plantas (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011).

O fungo *Fusarium* é um importante gênero de fitopatógenos causadores de podridões radiculares, murchas vasculares, podridões de sementes, produção de micotoxinas (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011) e tombamento de plântulas (BEDENDO, 2011).

Este patógeno é um anamorfo e suas formas perfeitas (teleomórficas) pertencem aos gêneros *Gibberella* e *Nectria*, considerado cosmopolita de solo, particularmente comuns em solos cultivados (PEREIRA; SOARES, 2012).

As espécies de *Fusarium* são relatadas como causadores de *damping off* em diversas culturas, como exemplo na beterraba (TIVELLI et al., 2011), no amendoim (LIMA; ARAÚJO, 1999; BELLETTINI et al., 2005), na mamoneira (LIMA et al., 1997), no milho (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013), no eucalipto (SANTOS et al., 2001), no paricá (MAFIA et al., 2003) e em tomateiro (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Fungos do gênero *Fusarium* podem sobreviver no solo por meio de estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (MICHEREFF et al., 2005b). Clamidósporos são esporos constituídos de uma única célula com o citoplasma condensado e uma espessa parede celular, formado por hifas de maneira intercalar ou terminal, que podem permanecer dormentes por longo período de tempo no solo (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

2.3 PATOSSISTEMAS ESTUDADOS

O feijoeiro comum é plantado durante todo o ano numa grande diversidade de ecossistemas, o que o torna suscetível a diversas condições desfavoráveis, entre estas as doenças, que são mais de 200 conhecidas para a cultura, tendo maior ou menor severidade, dependendo das condições em que se encontra o cultivo (CTSBF, 2012).

Dentre as principais doenças que acometem o sistema radicular do feijoeiro, estão as podridões por espécies do gênero *Pythium* (CASTRO et al., 2007). Este patógeno pode causar tombamentos de plântulas de pré e pós-emergência, sendo que as principais espécies são: *P. ultimum*, *P. irregulare* e *P. paroecandrum*, que preferem temperaturas abaixo de 20°C; e *P. myriotylum* e *P. aphanidermatum*, mais ativos em temperaturas mais altas, entre 20 a 35°C (BIANCHINI et al., 2005).

Condições de alta umidade no solo são favoráveis à doença e a sobrevivência do patógeno ocorre em sementes e restos culturais (CASTRO et al., 2007). A disseminação se dá principalmente por água e equipamentos que transportam solo infestado e restos de cultura (BIANCHINI et al., 2005).

Uma série de doenças pode acometer a cultura do pepino, sendo que em ambiente protegido, onde esta cultura é muito cultivada, estão às enfermidades causadas por *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005). Doenças causadas por fitopatógenos de solo como *S. sclerotiorum*, são muitas vezes responsáveis pelo abandono do cultivo protegido, pois os mesmos possuem estruturas de resistência que dificultam o seu controle (VIDA et al., 2004), neste caso escleródios.

Escleródios são massas compactas de hifas, cuja camada externa é altamente melanizada, conferindo proteção à dessecação e raios solares por vários anos no solo (PEREIRA; SOARES, 2012). Os escleródios ao germinarem de forma miceliogênica podem causar tombamentos de pré e pós-emergência em plântulas de pepino, enquanto que a germinação carpogênica desenvolve a doença característica do mofo branco na parte aérea (ETHUR et al., 2005).

Diversas doenças podem afetar a cultura da beterraba, entre elas o *damping off*, caracterizados por lesões deprimidas nos tecidos vegetais, que provocam o fendilhamento ou constrição do caule, podendo levar ao tombamento da plântula (MAZARO et al., 2009). O tombamento de plântulas em beterraba a campo geralmente aparece em reboleiras, e pode ser causado por espécies do gênero *Fusarium*, com maior ou menor intensidade dependendo dos seguintes fatores: histórico de cultivo da área; má drenagem e compactação do solo; alta

umidade do solo; altas densidades de plantio; cultivos sucessivos e temperaturas entre 15 e 25°C (TIVELLI et al., 2011).

2.4 MÉTODOS DE CONTROLE

Variedades resistentes não são encontradas para este tipo de doença, então as medidas indicadas para o controle destas enfermidades, passam pela redução do inoculo inicial, rápido desenvolvimento da plântula e evitar a ocorrência de determinadas condições ambientais que favoreçam a atuação do patógeno (BEDENDO, 2011), atuando de forma preventiva (TIVELLI et al., 2011).

A redução do inóculo inicial envolve o uso de sementes saudáveis, tratamento do solo e rotação de culturas. A sanidade das sementes pode ser obtida pelo tratamento das mesmas, de forma térmica, química ou biológica (BEDENDO, 2011).

Em várias culturas o tratamento químico é recomendado para garantir a sanidade das sementes. Bianchini et al. (2005), relatam que em feijoeiro, o tratamento químico das sementes é uma medida que pode ser utilizada para o controle do tombamento de plântulas, assim como em algodão (CHITARRA et al., 2008), beterraba (DIAS et al., 2009), mamoeiro (CAMPOS et al., 2009), alfafa (MENDES et al., 2001) e soja (ALMEIDA et al., 2005).

Os tratamentos térmicos de sementes podem ser utilizados para reduzir e/ou até mesmo inativar o inóculo presente externo e/ou interno as sementes, pela utilização de binômio tempo-temperatura que controle o patógeno e não prejudique a semente (BEDENDO et al., 2011).

Em algumas culturas a termoterapia de órgãos de propagação pode ser indicada. Silva et al. (2002) relatam que o tratamento térmico via calor seco pode ser utilizado para o controle de bacterioses transmitidas por sementes de tomate, sem prejuízos na germinação. Em maracujazeiro esta prática também é recomendada para evitar a propagação da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*), com a imersão das sementes em água a 50°C por 15 minutos, sem ocasionar prejuízos as sementes (FISCHER et al., 2005).

Sementes de cenoura podem ser tratadas com tratamento térmico via calor seco por 15 dias na temperatura de 70°C, sem prejuízos a qualidade fisiológica das sementes e eliminando todos os fungos (TRIGO et al., 1998).

As sementes podem ser tratadas também com agentes de controle biológico, que podem agir por antibiose, competição, parasitismo e/ou indução de mecanismos de resistência (BEDENDO et al., 2011).

Os fungicidas biológicos mais utilizados e pesquisados para tratamento de sementes, são os fungos do gênero *Trichoderma*, tendo bons resultados em várias culturas, como no algodoeiro (FARIA et al., 2003), pepino (ETHUR et al., 2005) e soja (LOHMANN et al., 2007).

Além de fungos, algumas bactérias podem ser também agentes antagonistas, como as descritas por Lucon et al. (2008), no qual identificou um isolado de *Pseudomonas fluorescens*, capaz de controlar o tombamento causado por *Pythium aphanidermatum* em plântulas de pepino.

A redução do inóculo inicial pode ser feita também através de diversos métodos culturais, fazendo a rotação de culturas, eliminando restos de culturas, aração e gradagem, incorporação de matéria orgânica no solo, diminuição da densidade de plantio, controle da irrigação e drenagem do terreno (BEDENDO et al., 2011). Berni et al. (2002) citam que a rotação de culturas milho feijão, resultaram em menores incidências de podridões radiculares por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*.

Além dos tratamentos culturais no solo, os tratamentos físicos também podem ser utilizados no controle de tombamento de plântulas, como o tratamento térmico do solo por vapor e a solarização do solo (ZAMBOLIM; JESUS JÚNIOR, 2012b). A solarização do solo pode ser recomendada no controle de tombamentos por *Pythium* em pepino (GHINI et al., 2002) e em crisântemo (BETTIOL et al., 1994) e murcha bacteriana por *Ralstonia solanacearum* em tomateiro (BAPTISTA et al., 2007).

Já a atuação em cima do ambiente e do hospedeiro, é conseguida pelo rápido desenvolvimento da plântula e melhorias das condições ambientais. Bedendo (2011) cita as seguintes condições a serem seguidas para controlar os problemas com tombamentos de plântulas: evitar o plantio em áreas naturalmente sujeitas a inundações; drenagem; controle da irrigação; uso de sementes com alto vigor; plantio a profundidades adequadas; evitar o excesso de adubação nitrogenada; e evitar a excessiva densidade de plântulas no viveiro e no campo.

Pode-se também atuar no controle deste tipo de doenças, induzindo mecanismos de resistência nas plântulas, pela utilização de agentes indutores ou eliciadores. Mazaro et al. (2009) citam a quitosana como potencial agente indutor a ser aplicado em sementes de beterraba e tomate no controle do tombamento por *Rhizoctonia*. Freddo et al.

(2012), observaram também potencial do mesmo produto na ativação de mecanismos de resistência, em sementes de *Acacia mearnsii* tratadas com o mesmo produto no controle de tombamentos por *Rhizoctonia solani*.

De uma forma geral o controle de doenças de plantas, incluindo os problemas por *damping off*, tem sido controlados na maioria das situações pela utilização de agroquímicos, protegendo as sementes ou tratando o solo, entretanto, de acordo com Neves e Neves (2007), a sociedade tem se preocupado com a preservação e com a conservação ambiental, aumentando desta forma, a demanda por produtos orgânicos, isentos de pesticidas.

Assim, métodos alternativos vêm sendo desenvolvidos para suprir esta demanda da sociedade. Morais (2009) relata que o uso de plantas medicinais como defensivos naturais na agricultura, especialmente pelo uso de seus óleos essenciais, trata-se de uma alternativa promissora, pois os vegetais são uma fonte inesgotável de moléculas, muitas desconhecidas, que podem servir de modelo para síntese química, de forma ambientalmente segura, com baixo custo e ainda assim eficazes no controle de fitopatógenos.

2.5 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O conjunto de reações químicas que tem lugar em um organismo, são denominadas de metabolismo. A maior parte do carbono, nitrogênio e energia, termina em moléculas comuns a todos as células, necessárias ao seu funcionamento, como aminoácidos, açúcares e lipídios, o que constitui o metabolismo primário. Uma parte do carbono, nitrogênio e energia, assimilados pelas plantas, servem para formação de moléculas orgânicas que não parecem ter função direta nos processos básicos e vitais de uma planta e que se denominam metabólitos secundários, ou seja, resultam do metabolismo secundário da planta (GARCÍA; CARRIL, 2009).

De acordo com Braz Filho (2010) o metabolismo primário é importante para o rendimento agrícola, enquanto que o metabolismo secundário contribui com os aromas, cores dos alimentos e resistência a pragas e doenças. Os metabólitos secundários possuem funções ecológicas específicas, como atraentes ou repelentes de animais, pigmentação de flores e frutos, ou até mesmo atuando nos mecanismos de defesa das plantas, como pesticidas naturais (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os vegetais em suas populações naturais conseguem se desenvolver em equilíbrio com suas populações de pragas e doenças graças as suas defesas, que provêm

principalmente do quimismo (MORAIS, 2009). O autor relata ainda que compostos advindos do metabolismo secundário, possuem uma característica ainda mais desejável, que é uma seletividade natural aos seus agressores, baixa toxicidade aos organismos úteis, o que é desejável na agricultura.

Em trabalhos desenvolvidos com a utilização de extratos brutos ou óleos essenciais de plantas, têm-se evidenciado o seu potencial no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta (inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos), quanto pela indução de componentes de defesa vegetal, evidenciando seu caráter muitas vezes elicitador (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). De acordo com Smith (1996), qualquer molécula de origem biótica ou abiótica, capaz de estimular respostas de defesa nas plantas, são considerados elicitores.

O efeito fungistático e fungitóxico de óleos essenciais obtidos a partir de vegetais, são relatados de forma positiva com potencial de uso em diversas áreas da agricultura. Em pós-colheita de frutos de banana, Bastos e Albuquerque (2004), relataram que o uso de óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos *in vitro* de *Colletotrichum musae*, e impediu as podridões nos frutos na concentração de 1%.

Em mamão, Carnelossi et al. (2009) citam que o uso de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Corymbia citriodora*, *Mentha arvensis* e *Artemisia dracunculul* controlaram a antracnose em frutos causada por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Em doenças foliares de grandes culturas, os óleos essenciais também vêm sendo testados. Medice et al. (2007) afirmam que os óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), nim (*Azadirachta indica*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) tem potencial na redução da severidade da ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrizi* em soja.

O óleo essencial de citronela também possui potencial no controle preventivo e curativo da brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (PERINI et al., 2011).

Os tombamentos de plântulas e as doenças radiculares também podem ser controlados pelo uso de óleos essenciais. Dhingra et al. (2004) observaram que o tratamento do solo de viveiro com óleo essencial extraído de sementes de mostarda (*Brassica rapa*), pode ser alternativa ao uso do brometo de metila para o controle do patógeno *Rhizoctonia solani*.

Steffen et al. (2008) relatam que os óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Cymbopogon citratus* têm potencial na redução dos níveis de severidade do nematoide *Meloidogyne graminicola* em raízes de arroz.

Os óleos essenciais são relatados também em diversos trabalhos na literatura como potenciais no controle de doenças de plantas, pela indução de compostos de defesa antimicrobianos (FRANZENER et al., 2007; MAZARO et al., 2008; VIGO et al., 2009).

Os óleos essenciais advindos de plantas medicinais, aromáticas e condimentares são em sua maioria de fácil obtenção e baixo custo, podendo ser uma alternativa viável a agricultura, devido ao seu caráter em sua maioria sistêmico, fácil degradação e pouco ou não fitotóxicos (MORAIS, 2009). Entretanto, o autor relata ainda que são produzidos por organismos vivos, que sofrem variações ambientais, o que pode variar a composição do óleo, necessitando de estudos mais elaborados para indicar sua aplicação.

2.6 *Aloysia citriodora* Palau

Espécies do gênero *Aloysia* (sin. *Lippia*), pertencentes a família Verbenaceae, são utilizadas na América do Sul e Central e na África Tropical, mais comumente para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, respiratórios e também como tempero. Algumas espécies deste gênero possuem atividades antimalária, sedativa, controle da hipertensão e antiinflamatória, devido a principalmente os óleos essenciais e compostos fenólicos (flavonóides) obtidos de extratos destas plantas (PASCUAL et al., 2001).

A *Aloysia citriodora* Palau é uma espécie da família Verbenaceae, popularmente denominada de cidró, cidró-pessegueiro, cidrão, erva-luísia e cidrozinho. Trata-se de um arbusto grande, muito ramificado, ereto, com aroma de citral, de 2 a 3 metros de altura, nativo da América do Sul, provavelmente Chile, cultivado em jardins e hortas domésticas, no sul do Brasil, principalmente para fins medicinais e ocasionalmente como condimentar na culinária, para temperar saladas e recheios (LORENZI, 2008).

Duke et al. (2002) citam que esta planta possui atividades antibacterianas, antissépticas, acaricidas, analgésica, antipulções, expectorante, calmante, sedativa, digestiva, tranquilizante, controle de dermatoses, diarreias, hemorroidas, insônia, tuberculoses e varicoses.

Quando *A. citriodora* atinge o máximo de crescimento, em plena floração, o óleo essencial da planta é constituído em 69% por geranial, neral e limoneno (ARGYROPOULOU et al., 2007). O maior componente volátil do óleo essencial desta planta é o citral, com 14,21% (ALI et al., 2011).

Sartoratto et al. (2004) em seu estudo *in vitro*, relataram que dentre vários óleos essenciais de plantas estudados, o óleo de *A. citriodora* apresentou a mais baixa Concentração Mínima de Inibição (CMI), de 0,05 mg.mL⁻¹ e 0,50 mg.mL⁻¹, contra os patógenos humanos *Enterococcus faecium* ATCC 10541 (Orla-Jensen) Schleifer & Kilpper-Balz e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, respectivamente, que são valores mais baixos que o antibiótico cloroamphenicol, utilizado neste experimento como controle.

Outras bactérias também podem ser controladas *in vitro* pelo óleo essencial de *A. citriodora*, como a *Helicobacter pylori* que infecta a mucosa do estômago humano (OHNO et al., 2003), *Escherichia coli* (DUARTE et al., 2007), *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (ALI et al., 2011).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *A. citriodora* é relatada também como inibitória *in vitro*, aos protozoários *Trypanosoma cruzi* causador da doença de Chagas e *Leishmania chagasi* causador da leishmaniose (ESCOBAR et al., 2010), antifúngica a *Candida albicans*, levedura causadora de candidíase (DUARTE et al., 2005; ALI et al., 2011).

O óleo essencial de *A. citriodora* tem potencial testado *in vitro* para controle de fungos fitopatogênicos também, exercendo efeito antimicrobiano parcial contra *Phanerochaete chrysosporium* agente causal de podridão branca em madeira (ALI et al., 2011). Efetividade contra os patógenos de pós-colheita em frutos, *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga e abacate, *Penicillium digitatum* isolado de frutos de cactos, *Botrytis cinerea* de uvas e *Alternaria citrii* de citros (COMBRINCK et al., 2011) e *Moniliophthora roreri* agente causal de moniliose em frutos de cacau (LOZADA et al., 2012). E alto efeito inibitório no crescimento micelial de *Fusarium verticillioides*, agente causal de podridões radiculares, do colmo, espigas e morte de plântulas em milho (LÓPEZ et al., 2004).

Por mais que se tenham resultados evidenciados na literatura acerca do potencial do óleo essencial de *A. citriodora* no controle de microrganismos, seus relatos ainda são escassos para a recomendação do seu uso na agricultura.

Assim, são necessários mais estudos em diversos patossistemas, bem como a aplicação prática, ou seja, além de testes *in vitro*, testar também *in vivo*. Desta forma, estudos que avaliem o potencial do uso do óleo essencial desta planta no controle de fitopatógenos causadores de tombamento de plântulas, são importantes para a agricultura em geral, na busca de novos métodos e novas moléculas para controle deste grupo de doenças.

2.7 REFERÊNCIAS

ALI, H.F.M.; EL-BELTAGI, H.S.; NASR, N.F. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3044-3053, 2011.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: doenças das plantas cultivadas**. Cap. 64. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 569-588, 2005.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 4. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 59-99, 2011.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

BAPTISTA, M.J.; REIS JÚNIOR, F.B.; XAVIER, G.R.; ALCÂNTARA, C.; OLIVEIRA, A.R.; SOUZA, R.B.; LOPES, C.A. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.7, p. 933-938, 2007.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Pipiper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BEDENDO, I.P. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 22. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA JÚNIOR, N.S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 17. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.

BELLETTINI, N.M.T.; ENDO, R.M.; MIGLIORANZA, É.; SANTIAGO, D.C. Patogenicidade de fungos associados às sementes e plântulas de amendoim cv. Tatu. **Ciências Agrárias**, v.26, n.2, p. 167-172, 2005.

BERNI, R.F.; SILVEIRA, P.M.; COSTA, J.L.S. Influência do preparo do solo e da rotação de culturas na severidade de podridões radiculares no feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, n.2, p. 69-74, 2002.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; GALVÃO, J.A.H. Solarização do solo para o controle de *Pythium* e plantas daninhas em cultura de crisântemo. **Scientia agrícola**, v.51, n.3, p. 459-462, 1994.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do Feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: doenças das plantas cultivadas**. Cap. 37. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 333-349, 2005.

BOLLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 229-239, 2010.

CAMPOS, S.C.; SILVEIRA, S.F.; SILVA, R.F.; VIANA, A.P.; CONCEIÇÃO, P.M. Tratamento químico de sementes de mamão visando ao controle de *Rhizoctonia solani*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.3, p. 192-197, 2009.

CARNELOSSI, P.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; MESQUINI, R.M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p. 399-406, 2009.

CASTRO, J.L.; ITO, M.F.; MARINGONI, A.C.; BALARDIN, R.S. **Desafios ao controle de doenças na cultura do feijoeiro nas regiões sul e sudeste do Brasil**. In: ITO, M.F.; PAGOTTO, C. Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro. **Documentos 79**, Campinas: Instituto Agronômico, p. 18-24, 2007.

CHITARRA, L.G.; GOULART, A.C.P.; ZORATO, M.F. Tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle de patógenos causadores de tombamentos de plântulas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p. 168-176, 2008.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

CTSBF – COMISSÃO TÉCNICA SUL BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na região sul brasileira**. 2 ed., Florianópolis: EPAGRI, 2012, 157p.

DHINGRA, O.D.; COSTA, M.L.N.; SILVA JÚNIOR, G.J.; MIZUBUTI, E.S.G. Utilização de óleo essencial de mostarda no controle de tombamento e requeima causadas por *Rhizoctonia solani* em viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DIAS, M.A.; AQUINO, L.A.; DIAS, D.C.F.S.; ALVARENGA, E.M. Qualidade fisiológica de sementes de beterraba (*Beta vulgaris* L.) sob condicionamento osmótico e tratamentos fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.188-194, 2009.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DUKE, J.A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M.J.; DUCCELLIR, J.; DUKE, P.A.K. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, 2 ed., 2002, 870p.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FARIA, A.Y.K.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; CASSETARI NETO, D. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p. 121-127, 2003.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: doenças das plantas cultivadas**. Cap. 53. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 467-474, 2005.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A.S.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M.P.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.1, p. 29-38, 2007.

FREDDO, Á.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, E.J.; WAGNER JÚNIOR, A. Efeito da quitosana na emergência, desenvolvimento inicial e caracterização bioquímica de plântulas de *Acacia mearnsii*. **Revista Árvore**, v.36, n.6, p. 1039-1045, 2012.

GARCÍA, A.Á.; CARRIL, E.P.-U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Série Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GHINI, R.; SCHOENMAKER, I.A.S.; BETTIOL, W. Solarização do solo e incorporação de material orgânica no controle de *Pythium* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.9, p. 1253-1261, 2002.

GOULD, A.N. Fungos fitopatogênicos e Oomicetos. In: TRIGIANO, Robert N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. **Fitopatologia**. Tradução: Marcelo Gravina de Moraes, 2 ed., Porto Alegre: Artmed, Cap. 10, p. 103-128, 2010.

KUHNEM JÚNIOR, P.R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E.M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p. 583-588, 2013.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: doenças das plantas cultivadas**. Cap. 67. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 607-626, 2005.

LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; SANTOS, J.W.. Fungos causadores de tombamento transportados e transmitidos pela semente da mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n.9, p. 915-918, 1997.

LIMA, E.F.; ARAÚJO, A.E. Fungos causadores de tombamento, transportados e transmitidos através da semente do amendoim. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.3, n.2, p. 71-76, 1999.

LOHMANN, T.R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J.R.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Rev. Bras. De Agroecologia**, v.2, n.2, p. 1665-1668, 2007.

LÓPEZ, A.G.; THEUMER, M.G.; ZYGADLO, J.A.; RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B₁ production in corn grain. **Mycopathologia**, v. 158, p. 343-349, 2004.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed., 2008, 544p.

LOZADA, B.S.; HERRERA, L.V.; PEREA, J.A.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronomica**, v. 61, n. 2, p. 94-102, 2012.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 696-697, 2008.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; ANDRADE, G.C.G.; ZAUZA, E.A.V.; PFENNING, L.H.; ROSA, J. Tombamento de mudas causado por *Fusarium solani*: uma nova doença do paricá no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.4, p. 450, 2003.

MARINGONI, A.C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. Cap. 31. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 285-291, 2005.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 8. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 149-206, 2011.

MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 1824-1829, 2008.

MAZARO, S.M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J.C.; GOUVÊA, A. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p. 1424-1430, 2009.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO JÚNIOR, R.G.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.1, p. 83-90, 2007.

MENDES, M.A.S.; LIMA, P.M.M.P.; FONSECA, J.N.L.; SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p. 148-152, 2001.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; PERUCH, L.A.M.; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, Domingos E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 1-18, 2005a.

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; PERUCH, L.A.M. Inóculo de patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 93-124, 2005b.

MOORMAN, G.; GWINN, K.D. Controle cultural de doenças de plantas. In: TRIGIANO, Robert N.; WINDHAM, Mark T.; WINDHAM, Alan S. **Fitopatologia**. Tradução: Marcelo Gravina de Moraes, 2 ed., Porto Alegre: Artmed, Cap. 35, p. 429-459, 2010.

MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap. 9, p. 139-152, 2009.

NEVES, M.C.P.; NEVES, J.F. **Agricultura Orgânica e Produção Integrada: diferenças e semelhanças**. Documentos 237, Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 20p., 2007.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KAHSIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.

OWNLEY, B.; BENSON, M. Fitopatógenos do solo. In: TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M.T.; WINDHAM, A.S. **Fitopatologia**. Tradução: Marcelo Gravina de Moraes, 2 ed., Porto Alegre: Artmed, Cap. 22, p. 237-253, 2010.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PEREIRA, O.L.; SOARES, D.J. Fungos fitopatogênicos. In: In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, O.L. **O essencial da fitopatologia – Agentes Causais**. Viçosa: UFV, Cap. 11, p. 225-308, 2012.

PERINI, V.B.M.; CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; AGUIAR, R.W.S.; LEÃO, E.U.; SEIXAS, P.T.L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.2, p. 23-27, 2011.

SANTOS, Á.F.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Circular Técnica 45, Colombo: EMBRAPA – CNPF, 8p., 2001.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SILVA, Â.M.S.; CARMO, M.G.F.; OLIVARES, F.L.; PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, p. 586-593, 2002.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45, 1996.

STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; BOSENBECKER, V.K.; STEFFEN, G.P.K.; LUPATINI, M.; CAMPOS, Â.D.; GOMES, C.B. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, v.32, n.2, p. 126-134, 2008.

TIVELLI, S.W.; FACTOR, T.L.; TERAMOTO, J.R.S.; FABRI, E.G.; MORAES, A.R.A.; TRANI, P.E.; MAY, A. **Beterraba: do plantio à comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2011, 45p.

TRIGO, M.F.O.; PIEROBOM, C.R.; NEDEL, J.L.; TRIGO, L.F.N. Tratamento térmico em sementes de cenoura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.3, p. 357-361, 1998.

VIANA, F.M.P.; KOBORI, R.F.; BETTIOL, W.; ATHAYDE SOBRINHO, C. Controle do tombamento de plântulas de feijoeiro causado por *Sclerotinia sclerotiorum* com a incorporação de matéria orgânica ao substrato. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p. 94-97, 2000.

VIDA, J.B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D.J.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VERZIGNASSI, J.R.; CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p. 355-372, 2004.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.; LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p. 293-304, 2009.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C. Efeito de doenças nas funções fisiológicas das plantas: classificação das doenças infecciosas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, O.L. **O essencial da fitopatologia – Agentes Causais**. Viçosa: UFV, Cap. 5, p. 73-108, 2012a.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C. Controle físico de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A. **O essencial da fitopatologia – Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, Cap. 10, p. 303-334, 2012b.

3. POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* NO CONTROLE DE *Pythium* sp. *IN VITRO* E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJOEIRO COMUM

3.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal, por meio da realização de quatro experimentos, avaliar o potencial do óleo essencial de *Aloysia citriodora* no controle de *Pythium* sp. *in vitro* e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijoeiro. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito fungistático e fungicida de concentrações (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) do óleo essencial em meio BDA, mais a testemunha (meio BDA puro), no crescimento micelial de *Pythium* sp., em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo considerada como unidade experimental uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro. No segundo experimento avaliou-se o efeito de concentrações (0,0625%; 0,125% e 0,25%) do óleo essencial de *A. citriodora* em meio de cultura líquido BD, em lâminas de microscopia, na germinação de esporângios de *Pythium* sp., em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições por tratamento, sendo considerada como unidade experimental uma lâmina de microscopia. O terceiro experimento avaliou o efeito fitotóxico potencial do óleo essencial de *A. citriodora*, quando aplicado nas sementes de feijoeiro cv. Uirapuru, em rolo de papel (RP), em concentrações (0,0625%; 0,125% e 0,250%) mais a testemunha (água destilada), conduzido em câmara de germinação, em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições, sendo consideradas como unidades experimentais, rolos de papéis com cem sementes cada. Avaliou-se pelas normas das Regras para Análises de Sementes (RAS), a porcentagem de germinação aos cinco e nove dias, a massa verde e o tamanho de plântula aos nove dias após a incubação. No quarto experimento, avaliou-se o efeito do tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora*, nas mesmas concentrações testadas no terceiro experimento, em substrato inoculado com *Pythium* sp., em delineamento inteiramente ao acaso, sendo considerada como unidade experimental, uma bandeja com vinte células, com uma semente por célula. Avaliou-se neste experimento: porcentagem de emergência; tombamento de plântulas de pós-emergência; massa verde média por plântula; altura média de plântulas; e análises bioquímicas (teor de proteínas; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1,3-glucanases e quitinases). Os resultados obtidos demonstraram que o óleo têm potencial de controle de tombamentos por *Pythium* sp. em feijoeiro, devido a sua

ação fungistática e fungicida direta e pela indução da atividade de peroxidases e β -1,3-glucanases.

Palavras-chave: controle alternativo; *Phaseolus vulgaris* L.; tratamento de sementes.

POTENTIAL OF *Aloysia citriodora* Palau oil IN THE CONTROL OF *Pythium* sp. IN VITRO AND IN THE RESISTANCE INDUCTION AT THE COMMON BEAN DAMPING OFF

3.2 ABSTRACT

This study aimed to, by conducting four experiments, evaluate the effect essential oil potential *Aloysia citriodora* in control of *Pythium* sp. *in vitro* and induction of resistance to bean damping off. In the first experiment evaluated the fungistatic and antifungal effect concentrations (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) of essential oil on PDA, plus the control (half pure PDA), in the micelial growth of *Pythium* sp., in a completely randomized design with four replicates per treatment, being considered as an experiment unit a Petri dish eight cm in a diameter. In the second experiment evaluated the effect of the essential oil of *Aloysia citriodora*, with the same concentrations tested in the first experiment on microscope slides, the germination os sporangia *Pythium* sp., in a completely randomized design with four replicates per treatment, it is considered as an experimental unit one microscope slide. The third experiment evaluated the phytotoxic or no effect of the essential oil of *A. citriodora* when applied in bean seeds cv. Uirapuru, in paper roll (PR) at concentrations (0,0625%; 0,125% e 0,250%) over the control (distilled water), conducted in germination chamber, in a completely randomized design, with five repetitions, considered experimental units, germitest papers a hundred seeds each. Rewied by the rules of the RAS, the germination percentage at five and nine dayw, green mass and seedling size, four and nine days after incubation. In the fourth experiment, evaluated the effect of the seed treatment with the essential oil of *A. citriodora*, at the same concentrations in the third experiment, in an substrate inoculated with *Pythium* sp., in a completely randomize design, being considered as an experimental unit, a tray of twenty cells, with one seed per cell. It was evaluated in this experiment: emergency percentage; damping off of post-emergence seedling; medium green mass per plant; average height of seedlings; and biochemistry (protein content; enzymatic

activity of peroxidases; phenylalanine ammonia lyase (PAL); β -1,3-glucanases and chitinases). The results showed that the oil has a potential for damping off control by *Pythium* sp. in bean because of its fungistatic and fungicidal direct action and the induction of peroxidase and β -1,3-glucanases activity.

Key-words: alternative control; *Phaseolus vulgaris* L.; seeds treatment.

3.3 INTRODUÇÃO

Diversas doenças acometem a cultura do feijoeiro, podendo acarretar perdas de 50% da produtividade ou até mesmo perdas totais, caso medidas adequadas de controle não sejam tomadas (CTSBF, 2012).

Dentre as doenças que ocorrem nesta cultura, estão os tombamentos de plântulas causados por cromistas do gênero *Pythium*. Os danos por infecções severas deste patógeno podem causar a morte da plântula em pré ou pós-emergência, e caso isto não ocorra, poderá ocasionar subdesenvolvimento, clorose, murcha e redução de produção (BIANCHINI et al., 2005).

Não existem variedades resistentes a este tipo de doenças, então deve-se tomar medidas de controle que promovam o rápido desenvolvimento da plântula, rotação de culturas, evitar altas densidades de plantas, drenagem do solo e o tratamento térmico, biológico ou químico de sementes (BEDENDO, 2011).

O tratamento químico constitui-se em uma das principais medidas de controle de patógenos causadores de tombamento. No entanto, de acordo com Neves e Neves (2007) a sociedade tem demandado produtos orgânicos isentos de pesticidas químicos, buscando melhor qualidade alimentar.

As plantas medicinais podem ser exploradas na obtenção de pesticidas naturais, pelo uso de seus extratos brutos e/ou óleos essenciais (MORAIS, 2009). Os seus extratos brutos e/ou óleos essenciais, possuem potencial no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta (inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos), quanto pela indução de componentes de defesa vegetal, evidenciando seu caráter muitas vezes elicitador (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Elicitor, de acordo com Smith (1996), é qualquer molécula de origem biótica ou abiótica, capaz de estimular respostas de defesa nas plantas.

A *Aloysia citriodora* Palau é uma espécie da família Verbenaceae, popularmente denominada de cidró, cidró-pessegueiro, cidrão, erva-luísia e cidrozinho. Trata-se de um arbusto grande, muito ramificado, ereto, com aroma de citral, de 2 a 3 metros de altura, nativo da América do Sul, provavelmente Chile, cultivado em jardins e hortas domésticas, no sul do Brasil, principalmente para fins medicinais e ocasionalmente como condimentar na culinária, para temperar saladas e recheios (LORENZI, 2008).

Esta planta possui em seu óleo essencial, diversos componentes, como o geranial, neral, limoneno (ARGYROPOULOU et al., 2007) e citral (ALI et al., 2011). Diversos trabalhos *in vitro* relatam o seu potencial antibacteriano (SARTORATTO et al., 2004; OHNO et al., 2003; DUARTE et al., 2007; ALI et al., 2011), antimicrobiano (ESCOBAR et al., 2010) e antifúngico (DUARTE et al., 2005; ALI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2004; COMBRINCK et al., 2011; LOZADA et al., 2012).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do uso de óleo essencial de *A. citriodora*, no controle *in vitro* de *Pythium* sp., bem como na indução de resistência em plântulas de feijoeiro a esta doença, pelo tratamento das sementes com este produto.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As plantas de *A. citriodora* foram cultivadas na Horta do Campus Dois Vizinhos da UTFPR. Para extração do óleo essencial das plantas, seguiu-se a metodologia descrita por Paulus et al. (2013) para a espécie. As plantas foram cortadas no mês de maio de 2014, no início da manhã e no estágio vegetativo em que se encontravam com 30 a 50 cm de altura. Uma excisada da espécie foi coletada e depositada no Herbário Botânico do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, onde foi realizada a identificação taxonômica pelo curador do herbário, sendo que o código do depósito foi registrado sob o número DVPR 842.

Logo após o corte, as folhas das plantas foram separadas e seccionadas em porções menores. Após, foram colocadas em aparelho de hidrodestilação, modelo Clevenger do Laboratório da Horta, para extração do óleo essencial.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitossanidade da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, onde, o isolado utilizado no trabalho foi obtido a partir de plântulas de feijoeiro infectadas com *Pythium* sp. O patógeno foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar), incubado em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, sendo repicado até a obtenção de colônias puras do fungo.

O primeiro experimento *in vitro* consistiu em avaliar o crescimento radial do patógeno em placas de Petri. Os tratamentos consistiram de seis concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) mais a testemunha (água destilada), em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo considerada como repetição, cada placa de Petri utilizada.

O óleo essencial foi incorporado em meio BDA já autoclavado na temperatura de 120°C por vinte minutos, após o seu resfriamento (temperatura em torno de 40°C) e vertido em placas de Petri de 8 cm de diâmetro. Após, as placas foram esterilizadas abertas em câmara de fluxo laminar, com luz ultravioleta germicida por dez minutos.

O patógeno foi manipulado em câmara de fluxo laminar, sendo colocado no centro de cada placa, na forma de disco de micélio puro, com o diâmetro de 7 mm. Após as unidades experimentais foram fechadas e vedadas com papel filme plástico. Marcou-se com caneta de retroprojeter, nas tampas, os diâmetros A e B, de forma perpendicular, onde foram feitas as avaliações do crescimento radial dos fungos.

As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento, submetidas à temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de doze horas. O experimento encerrado quando a primeira placa foi atingida nas bordas pelo crescimento radial do fungo, tendo ocorrido isto em dez dias.

No segundo experimento *in vitro*, avaliou-se a germinação de esporângios de *Pythium* sp., em função de concentrações (0,0625%; 0,125%; 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora* diluído em meio líquido BD (batata dextrose) mais a testemunha, onde utilizou-se apenas o meio de cultura. Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso com cinco repetições para cada tratamento. As unidades experimentais consistiram de uma lâmina para microscopia com 1 mL do tratamento.

O óleo essencial foi incorporado ao meio autoclavado após o seu resfriamento (aproximadamente 40°C), recebendo em seguida suspensão do inóculo do patógeno. O inóculo de *Pythium* sp. foi proveniente de placa de Petri com meio BDA, cultivado por dez

dias. Para obtenção da suspensão de esporângios, foi adicionado 20 mL de água destilada e esterilizada na placa. Com auxílio de escova de cerdas macias, procedeu-se a raspagem das colônias.

As suspensões provenientes da raspagem foram filtradas em camada dupla de gases esterilizadas. Para serem adicionadas ao meio de cultura, procedeu-se a calibração da suspensão de esporângios em Câmara de Neubauer (hemocitômetro) para $2,2 \times 10^6$ conídios mL^{-1} . As lâminas foram primeiramente esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 minutos e após, receberam 1 mL dos tratamentos com a suspensão do inóculo de esporângios de *Pythium* sp. Após, as lâminas com seus respectivos tratamentos e o inóculo do patógeno, foram acondicionadas em caixas plásticas transparentes esterilizadas, forradas com papel filtro esterilizado e umedecido com água deionizada. As caixas plásticas foram por sua vez, foram colocadas em câmara de crescimento a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 24 horas.

Avaliou-se a germinação dos primeiros vinte esporângios de *Pythium* sp., visualizados em microscópio óptico, do canto esquerdo superior, em direção ao canto direito superior da lâmina. Foram considerados germinados os que possuíam iniciação do tubo germinativo visível ao avaliador.

TESTE DE FITOTOXIDEZ DO ÓLEO ESSENCIAL NAS SEMENTES

No terceiro experimento, realizado no Laboratório de Análise de Sementes da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, procedeu-se a avaliação do efeito do óleo essencial na germinação de sementes de feijão. Os tratamentos avaliados consistiram de concentrações (0,0625%, 0,125% e 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora* em água destilada, mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%). O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com cinco repetições.

Utilizaram-se sementes salvas de feijão, cv. Uirapuru, produzidas na safra 2013/14, provenientes de área de lavoura do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, com poder germinativo de 98%. As sementes não passaram por beneficiamento pós-colheita e também não receberam tratamento químico comercial.

Antes de receberem os tratamentos com óleo essencial, as sementes foram previamente desinfestadas por cinco minutos em imersão em água destilada com hipoclorito de sódio a 5%. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas em papel absorvente para secagem. Os tratamentos foram aplicados nas sementes

em embalagens plásticas transparentes até obtenção de mistura uniforme. Utilizou-se 10 mL de cada tratamento, para tratar cada repetição de 100 sementes.

Avaliou-se a porcentagem de germinação de acordo com as Regras para Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), com quatro repetições de cem sementes. Foram realizadas contagens aos cinco e aos nove dias após a implantação dos testes. Utilizou-se o substrato de rolo de papel para germinação de sementes (RP), umedecidos 2,5 vezes sua massa com água destilada. Após a montagem, o teste de germinação foi conduzido em câmara germinadora modelo Mangelsdorf, na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$. A reposição de água foi realizada mediante constatação visual de reumedecimento do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O comprimento de plântulas e massa fresca de plântulas foi realizado de acordo com metodologia proposta por Nakagawa (1994), com cinco repetições de 20 sementes, colocadas para germinar em RP no interior de câmara germinadora modelo Mangelsdorf. Aos nove dias, com o uso de papel milimetrado, procedeu a medição da parte aérea e de raízes das plântulas germinadas, sendo o resultado expresso em milímetros por plântula.

A determinação da massa de matéria fresca de plântulas foi conduzida conjuntamente com o teste de comprimento de plântulas. Após a medição das plântulas, realizou a pesagem individual das mesmas e o resultado foi expresso em gramas por plântula.

TESTE EM SUBSTRATO INOCULADO COM O PATÓGENO

O quarto trabalho foi realizado na Câmara de Crescimento do Laboratório de Fitossanidade do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, onde avaliou-se o efeito do óleo essencial no tratamento de sementes, no desenvolvimento das plântulas e na proteção contra o tombamento de plântulas, em substrato inoculado com *Pythium* sp. Os tratamentos utilizados foram concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0625%; 0,125% e 0,250%) em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%), em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições.

Cada unidade experimental consistiu de bandejas de isopor, com dimensão de 70 X 40 X 6 cm. Estas possuíam cem células cada, com dimensão de 35 X 35 mm na parte superior e 10 X 10 mm na cavidade inferior e altura de 60 mm. Cada célula recebeu substrato inoculado com micélio de *Pythium* sp. e uma semente de feijão.

As sementes utilizadas foram da mesma procedência do experimento em RP anterior. Os procedimentos para desinfecção das sementes, bem como o tratamento destas com o óleo essencial, também seguiram os mesmos procedimentos do experimento em RP.

O substrato utilizado no experimento foi da marca Tecnomax® para horticultura, contendo casca de pínus, casca de arroz carbonizada, carvão vegetal e vermiculita, compostadas e carbonizadas. Realizou-se a desinfecção do substrato em autoclave por quarenta minutos a 120°C.

O inóculo de *Pythium* utilizado no experimento foi proveniente das placas de Petri utilizadas como testemunha no experimento inicial, o qual foi misturado a grãos de trigo autoclavados, em embalagens plásticas, contendo meio quilo do cereal. Estas embalagens permaneceram em câmara de crescimento a 24°C±1°C e fotoperíodo de 12 horas por 60 dias, quando os patógenos haviam colonizado todo o substrato.

Após, os grãos de trigo miceliados com o inóculo, foram misturados ao substrato autoclavado, na quantidade de 20g. Kg⁻¹. O substrato inoculado com o patógeno foi colocado nas bandejas de isopor, onde foi deixado por dez dias antes da semeadura do feijão, com irrigações diárias, com a finalidade de adaptar o patógeno ao máximo às condições do experimento.

As sementes, logo após terem sido tratadas com o óleo essencial, foram semeadas nas bandejas com os substratos infestados. As células então foram umedecidas e colocadas na Câmara de Crescimento, à temperatura de 25°C±2°C e 65%±10% de umidade relativa, por nove dias. As células foram umedecidas sempre que necessário, evitando a dessecação.

Foram realizadas duas avaliações, de acordo com a Regra de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo a primeira aos cinco dias e a segunda, aos nove dias após a implantação dos testes. As cinco dias, realizou-se a contagem de sementes emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem de emergência.

Na segunda avaliação, realizou-se a contagem de sementes emergidas e de plântulas com tombamento de pós-emergência. Após, as plântulas foram retiradas com cuidado das células, evitando a sua quebra, lavadas em água corrente e dispostas sobre papel absorvente para secagem. Em seguida, procedeu-se a mensuração do comprimento das plântulas em papel milimetrado e a pesagem em balança analítica para obter a massa fresca. Os resultados da avaliação realizada aos nove dias foram expressos em porcentagem de emergência, porcentagem de tombamentos de plântulas em pós-emergência, comprimento médio de plântulas e massa fresca média por plântula.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS TECIDOS VEGETAIS

Ao final do quarto experimento, separou-se material vegetal mixto com raízes e parte aérea das plântulas de feijão, que foram lavadas, picadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -20°C até as avaliações bioquímicas. As avaliações bioquímicas realizadas foram as seguintes: teor de proteínas totais; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1,3-glucanases e quitinases.

O teor de proteínas totais foi avaliado utilizando-se o método descrito por Bradford (1976), onde as amostras foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 RPM por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante obtido do processo foi coletado e levado para leitura em espectrofotômetro a 630 nm, com soro albumina bovina como padrão.

A quantificação da atividade das peroxidases foi adaptada do método descrito por Matsuno e Uritani (1972). As amostras de tecido vegetal, com peso médio de 0,260 g, foram maceradas em almofariz gelada, e então, adicionou-se 5 mL de solução extratora – tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Após, foram colocados 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma); e o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 4.000 RPM em temperatura de 4°C . O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático.

A análise de atividade da enzima peroxidase foi realizada por meio dos seguintes passos: em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0), 0,5 mL de água oxigenada a 3%, 0,5 mL de guaiacol 0,5% e 3,0 mL da amostra extraída do tampão pH 7. Esta mistura foi levada para incubação em banho-maria, por 15 minutos, a 30°C .

Após incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de bissulfito de sódio. As leituras foram realizadas após 10 minutos de repouso, em espectrofotômetro, em comprimento de ondas de 450 nm.

Para avaliação da enzima FAL, as amostras foram transferidas e maceradas em almofariz previamente gelado, onde se acresceu 6,0 mL do tampão de extração a 4°C , o qual foi preparado com mistura de 22,2 g de Tris (Tri hidroximetil-aminometano); 0,37 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP (polivinilpirrolidona), completando-se o volume para 1000 mL com água destilada e ajustando-se o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N.

Após a maceração em solução tampão, as amostras foram centrifugadas a 6000 RPM por 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi diluído pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração.

A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Pipetou-se 1,5 mL de cada extrato enzimático em tubos de ensaio, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg. mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”.

Incubou-se a 40°C por uma hora a mistura, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras em espectrofotômetro, modelo NT-805 NOVATÉCNICA, a 290 nm (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).

Para dosagem das atividades de quitinase e β-1,3-glucanase, as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 RPM por 25 min, a -4°C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada pela liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β-1,3-glucanase nos extratos será utilizado como substrato solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg mL⁻¹, LoeweBiochemicaGmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo et al. (1996).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, primeiramente verificando a normalidade dos dados com o Teste de Lilliefors. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância e análise de regressão quando necessário. Os dados que não possuíam distribuição normal, verificou-se a possibilidade de transformação dos dados para nova análise de variância. Na impossibilidade de avaliar com os dados transformados, procedeu-se a comparação entre os tratamentos, pelo desvio padrão da média.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial *in vitro* de *Pythium* sp. foi influenciado pelas concentrações do óleo essencial de *A. citriodora*, sendo que a partir das doses de 0,0625% houve redução significativa e em doses iguais e acima de 0,125%, o patógeno não cresceu no meio de cultura (Figura 1).

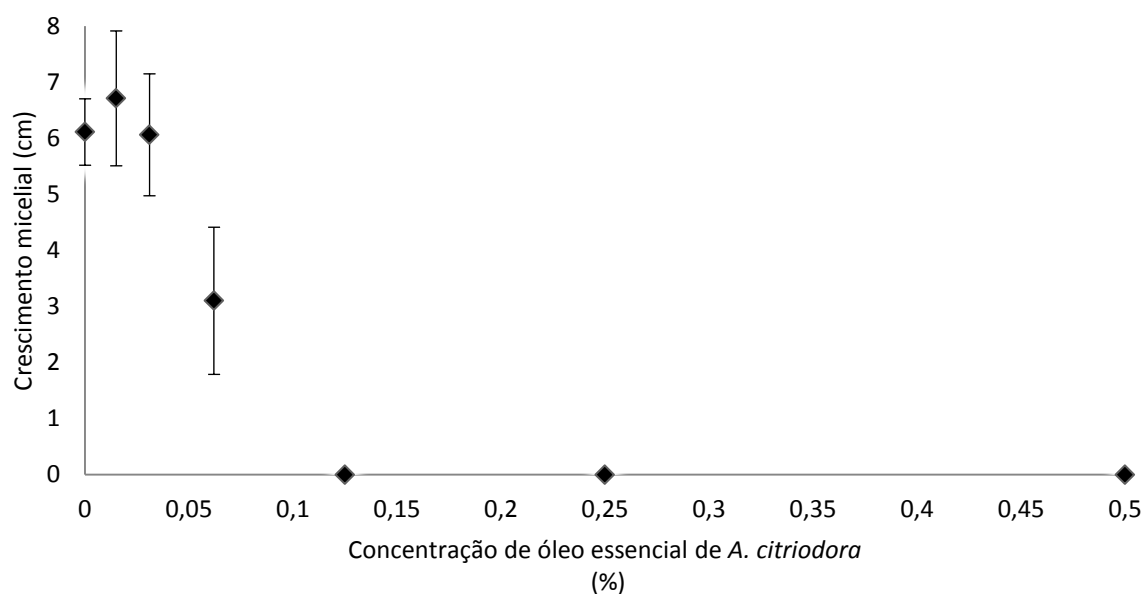


Figura 1: Crescimento micelial de *Pythium* sp. em função de diferentes concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, dez dias após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

Trabalhos apresentados pela literatura demonstram que esta espécie possui potencial antifúngico em baixíssimas concentrações, assim como apresentado neste trabalho. Como em Lozada et al. (2012), onde os autores observaram que a utilização de óleo essencial de *A. citriodora* e de outras espécies de *Aloysia*, tiveram efeito *in vitro* na redução do crescimento do fungo *Moniliophthora roreri*, causador de monilíose em cacau, na concentração de 0,2% e inibição total do micélio do patógeno nas dosagens de 0,8% a 1%.

Concentrações menores e com potencial antifúngico desta planta também são encontrados na literatura. Combrinck et al. (2011) verificaram que a concentração mínima necessária de óleo essencial de *A. citriodora* para inibir 100% do crescimento micelial *in vitro* dos patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* do abacate e da manga, *Alternaria citrii* de

laranjas, *Botrytis cinerea* de uvas foi de 0,2%, e para *Penicillium digitatum* de laranjas e *Lasiodiopodia theobramae* de mangas foi de 0,3%.

Na concentração de 0,025% em meio BDA *in vitro*, o óleo essencial desta planta reduziu o crescimento micelial, nas taxas de 69,4% para *B. cinerea*, 68,2% para *Phytophthora citriophthora*, 44,4% para *Penicillium digitatum* e em 40,4% para *Geotrichum citri-aurantii* (BOUCHRA et al., 2003).

López et al. (2004) observaram resultados ainda mais pronunciados, onde verificaram efeito significativo na redução do crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium verticillioides* na faixa de concentração de 0,025% a 0,05%.

A germinação de esporângios de *Pythium* sp. foi influenciada pelo óleo essencial de *A. citriodora* de forma linear decrescente, com o aumento da concentração do produto no meio de cultura onde foram microcultivados (Figura 2). De acordo com os resultados obtidos, a cada aumento de 0,0625% na concentração do óleo essencial no meio BD, houve diminuição de 13,22% na germinação dos esporângios do patógeno, até chegar a 0% de germinação, na concentração maior testada (0,25%).

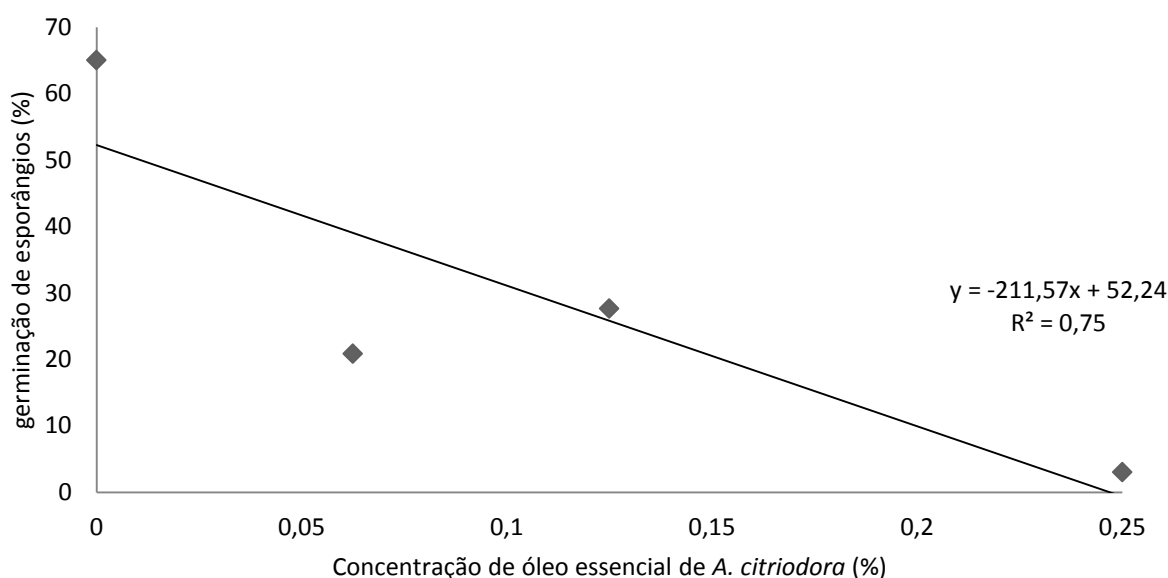


Figura 2: Porcentagem de esporângios de *Pythium* sp. germinados, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, vinte e quatro horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro, Pato Branco, PR, 2015.

Estes resultados demonstram que o óleo desta planta possui ação fungistática e também fungicida, pois chegou-se a concentrações onde nas quais, paralisou-se a germinação de esporângios e também não houve crescimento micelial do patógeno.

A composição química do óleo essencial de *A. citriodora*, em condição ecológica semelhante, mesma época do ano, estágio vegetativo, tipo de coleta e extração, observado por Paulus et al. (2013), revelou que os principais componentes são o citral (geranial + neral) (49,69%), seguido de limoneno (14,10%).

O citral presente em óleos essenciais de várias plantas possui efeito antifúngico. Em citronela (*Cymbopogon citratus*) é relatado com potencial a várias espécies de fungos, como *Candida albicans*, *Alternaria citrii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Helminthosporium compactum*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichophyton mentagrophytes* (PATTNAIK et al., 1997) e *Rhizoctonia solani* (GONÇALVES, 2012). Extraído de *Lippia alba*, este composto teve atividade antifúngica a *Aspergillus fumigatus* e *Candida krusei* (MESA-ARANGO et al., 2009).

O limoneno presente em óleos essenciais das plantas *Mentha spicata* e *Anethum sowa* também é relatado com efeito antifúngico a vários patógenos humanos (AGGARWAL et al., 2002).

A porcentagem de germinação de sementes de feijão em RP aos cinco dias não foi influenciada pelas concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* testadas. Entretanto, aos nove dias, esta variável foi afetada, demonstrando efeito fitotóxico quando a concentração for elevada, sendo que isto foi observado em 0,25% (Figura 3). Ou seja, a exposição mais prolongada e em maiores concentrações apresenta maiores sintomas de fitotoxidez, diminuindo o potencial germinativo em feijão.

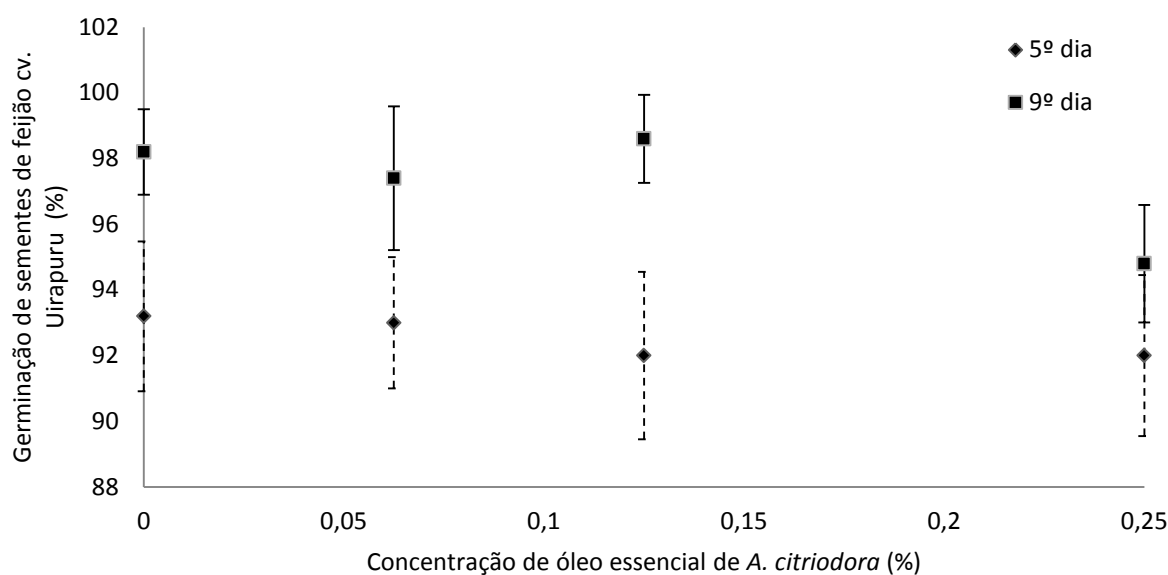


Figura 3: Porcentagem de germinação de sementes de feijoeiro cv. Uirapuru em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 2015. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

O efeito fitotóxico de extratos brutos aquosos de *A. citriodora* foram observados sobre as plantas daninhas *Bidens subalternans* e *Euphorbia heterophylla*, onde observou-se inibição da germinação das sementes e menor comprimento da radícula (CARATTI et al., 2012). Queli et al. (2012) também observaram este efeito, aumentando o tempo de germinação de sementes de alface e da daninha *Bidens pilosa*, quando comparadas ao tratamento controle.

Entretanto, na variável comprimento de plântula, não houve efeito significativo pelo tratamento das sementes com óleo essencial (Tabela 1) e na massa verde média por plântula de feijoeiro, houve aumento dos valores com o aumento da concentração do óleo essencial (Figura 4). A cada aumento de 0,0625% da concentração do óleo aplicado nas sementes de feijão, houve aumento de 5,02% na massa fresca das plântulas de feijoeiro.

Este comportamento observado no teste de germinação em RP, demonstra que o óleo essencial de *A. citriodora* pode ser fitotóxico à germinação em concentrações mais elevadas, no entanto, sementes menos sensíveis são influenciadas de forma positiva, aumentando a sua massa (Figura 4). A maior produção de massa fresca nas plântulas com as sementes tratadas com maiores concentrações do óleo, pode indicar a presença de compostos que estimulem o desenvolvimento metabólico do feijoeiro.

Tabela 1: Comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Comprimento de plântula (cm)
0,0000	13,80 ns
0,0625	14,48
0,1250	13,46
0,2500	13,30

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

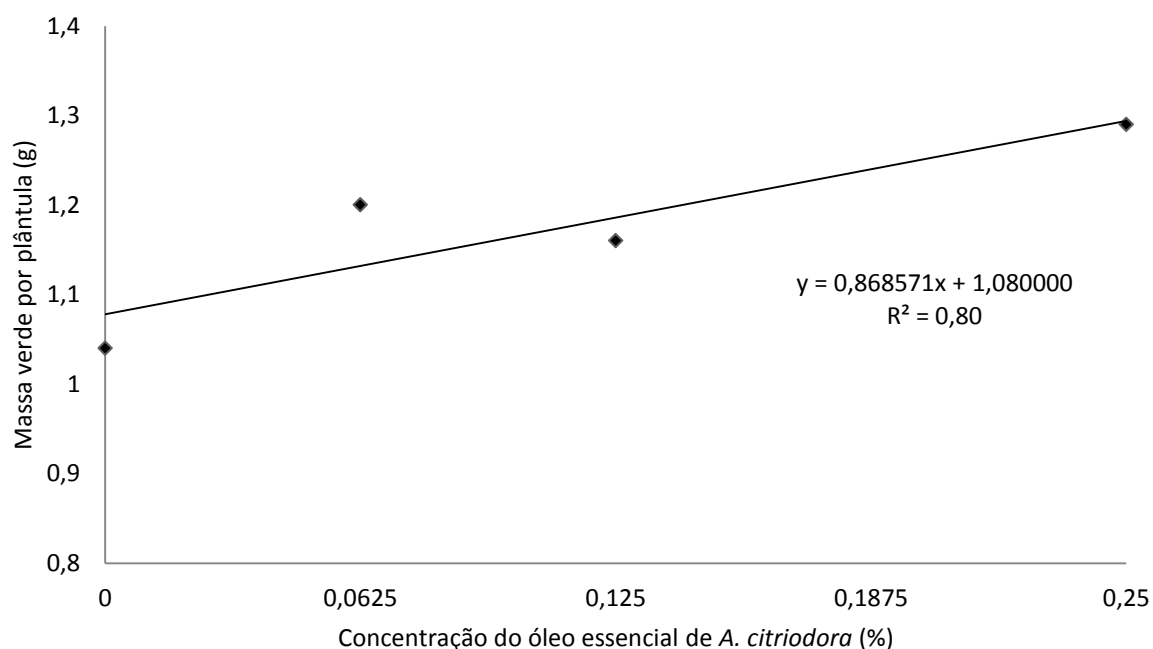


Figura 4: Massa verde média por plântula de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Em substrato inoculado com o patógeno *Pythium* sp., aos cinco dias, observou-se efeito quadrático da aplicação do óleo essencial nas sementes de feijoeiro, na emergência das plântulas (Figura 5). Concentrações testadas acima de 0,165% de óleo essencial, aumentaram o valor dessa variável e abaixo disto diminuíram a emergência das plântulas de feijoeiro.

No entanto, aos nove dias, o efeito do uso do óleo nas sementes, ficou mais evidenciado, pois as plântulas apresentaram maior emergência com o aumento da concentração do óleo essencial utilizado no tratamento, de forma linear crescente (Figura 5). Aos nove dias, a cada aumento de 0,0625% da concentração do óleo utilizado no tratamento das sementes de feijão, houve aumento de 2,99% na porcentagem de emergência das plântulas de feijoeiro em substrato inoculado com o patógeno estudado. Ou seja, pode ter ocorrido tombamento de pré-emergência nos tratamentos com menor concentração do óleo essencial.

Este resultado pode estar relacionado com o efeito fungistático e fungicida observado nos experimentos realizados *in vitro* (Figuras 1 e 2). Algum princípio ativo presente no óleo extraído desta planta pode ter formado uma proteção inicial da semente em germinação, muito provavelmente o citral, devido a maior proporção encontrada e a efeitos antifúngicos já descritos (PATTNAIK et al., 1997; MESA-ARANGO et al., 2009; GONÇALVES, 2012).

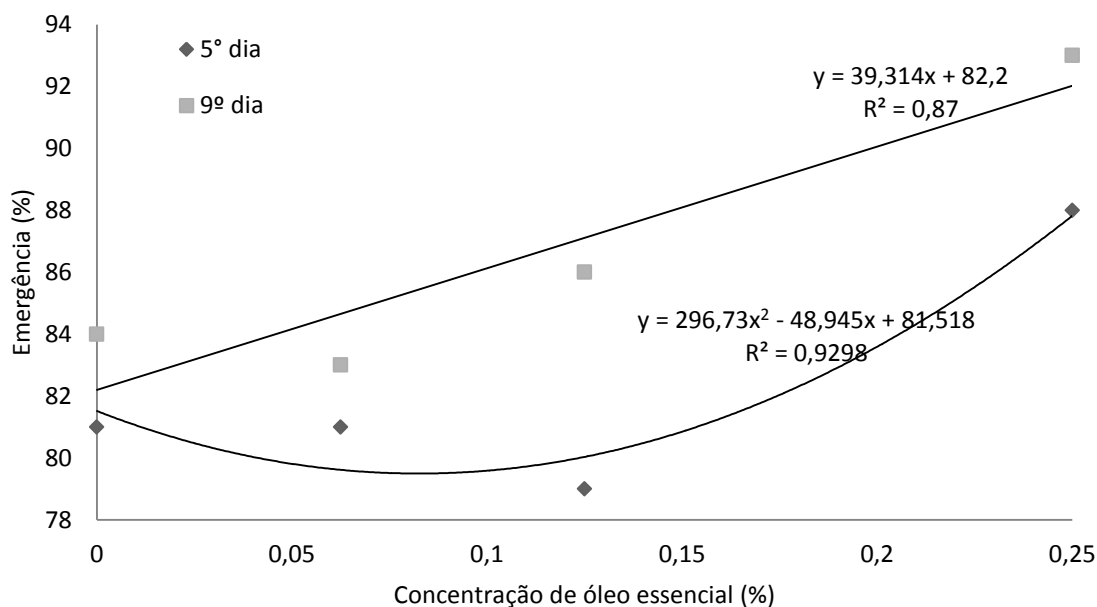


Figura 5: Porcentagem de emergência aos quatro e nove dias, de plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\% \pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Entretanto, as demais variáveis avaliadas (comprimento de plântulas e massa verde por plântula) em substrato inoculado com o patógeno, não foram influenciadas pelo tratamento com óleo essencial de *A. citriodora* (Tabela 2).

Tabela 2: Comprimento e massa verde de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Comprimento de plântula (cm)	Massa verde por plântula (g)
0,0000	27,24 ns	1,53 ns
0,0625	27,65	1,50
0,1250	28,69	1,58
0,2500	28,18	1,66

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O tombamento de pós-emergência em feijoeiro também foi influenciado de forma significativa pelo tratamento das sementes com óleo essencial, sendo que nas concentrações maiores de *A. citriodora*, não houve ocorrência do sintoma às plântulas (Figura 6), corroborando com seus efeitos fungistáticos e fungicidas já observados (Figuras 1 e 2).

Com relação às análises bioquímicas de proteínas totais, atividade de fenilalanina amônia-liase e de quitinase, não houve efeito significativo da aplicação de concentrações de óleo essencial nas plântulas de feijoeiro (Tabela 3). Pode-se inferir também, que não houve ativação destes mecanismos de defesa na planta, ou que estes não foram avaliados no momento correto, pois nove dias após a aplicação dos tratamentos pode ter passado o pico de ativação destes mecanismos.

No entanto, as atividades de peroxidases (Figura 7) e de β -1,3-glucanases (Figura 8), foram influenciadas positivamente pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora*.

A atividade enzimática de peroxidases aumentou conforme o aumento da concentração do óleo essencial utilizado no tratamento das sementes, entretanto, foi de maior intensidade nas menores concentrações utilizadas. Estes resultados podem ter corroborado com o aumento da porcentagem de emergência e diminuição dos tombamentos de pós-emergência em substrato inoculado com *Pythium* sp.

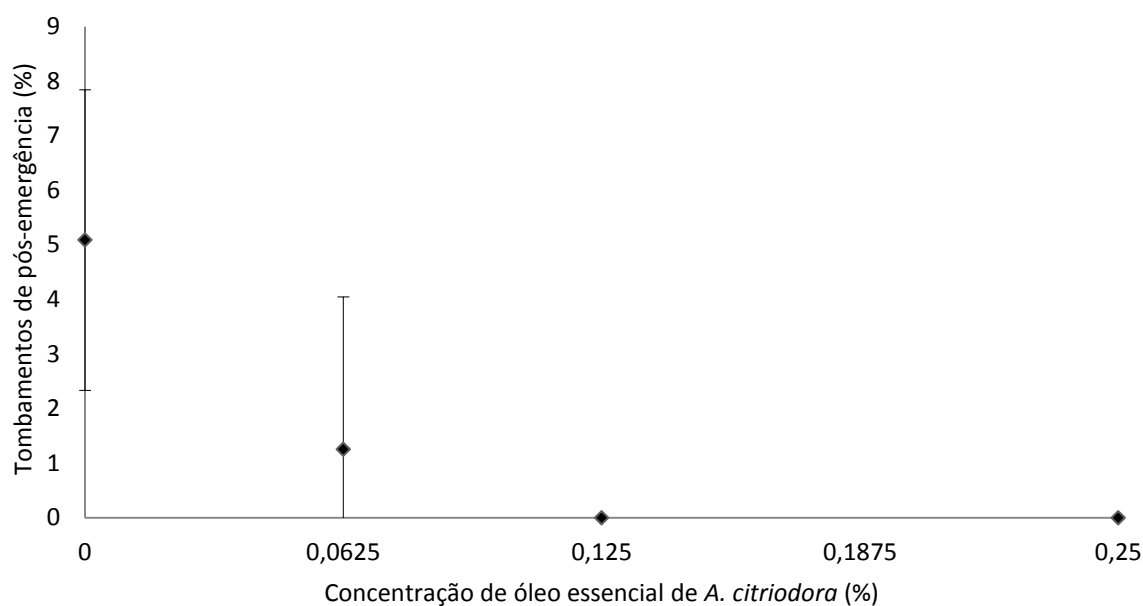


Figura 6: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

Tabela 3: Teores de proteínas totais, atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) e quitinases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Proteínas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido)	FAL ($\text{UAbs}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)	Quitinase (Unidade enzimática. mg^{-1} de proteína)
0,0000	3,11 ns	0,0133 ns	0,0212 ns
0,0625	2,79	0,0170	0,0200
0,1250	2,68	0,0168	0,0240
0,2500	2,77	0,0176	0,0216

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O aumento da atividade enzimática de peroxidases pela aplicação de indutores abióticos e bióticos em tecidos de feijoeiro, têm sido relatado por diversos autores (CAMPOS et al., 2004; KUHN, 2007; VIECELLI et al., 2009; VIECELLI, et al., 2010; SBALCHEIRO, et al., 2009).

As peroxidases tem importante papel na polimerização final da lignina, oxidando as hidroxilas dos grupos fenólicos, aumentando o seu teor nos tecidos vegetais, tendo um alto potencial de contribuição na defesa das plantas, pois interferem no crescimento dos patógenos, pela modificação química das paredes celulares, aumentando assim a resistência destas à ação de enzimas degradadoras das mesmas e na diminuição da difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno (PASCHOLATI, 2011).

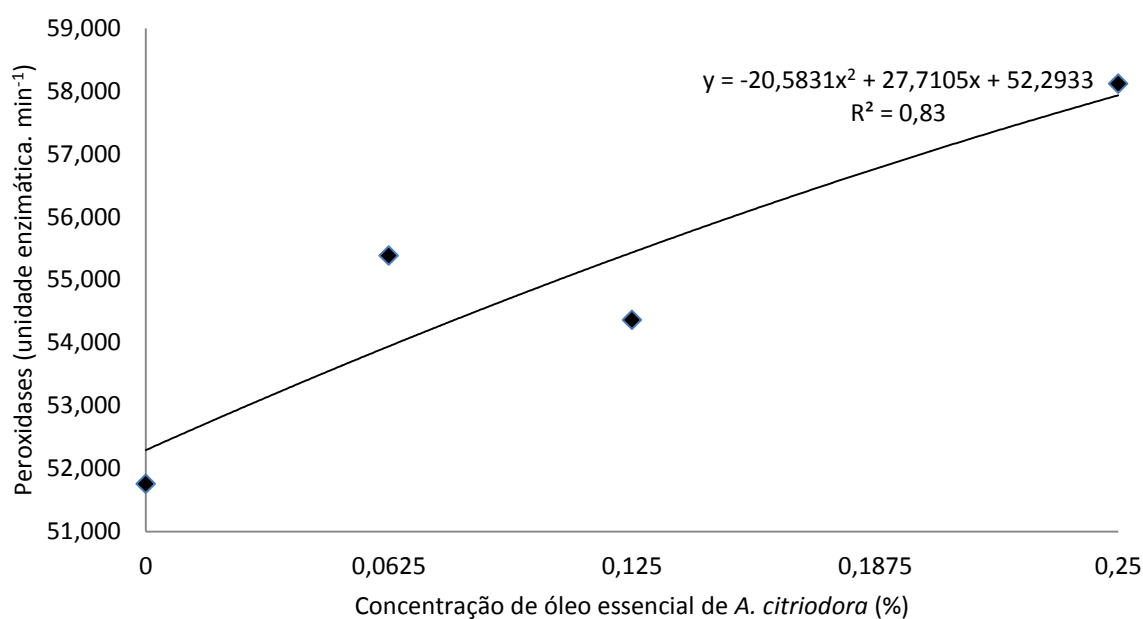


Figura 7: Atividade enzimática de peroxidases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

Com relação às β -1,3-glucanases, o tratamento das sementes influenciou positivamente na atividade destas enzimas em plântulas de feijoeiro, tendo como ponto de máxima a concentração de 0,136% de óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 8).

O aumento da atividade de β -1,3-glucanases assim como os de peroxidases, também pode ter contribuído para proteção das plântulas e assim com o aumento da porcentagem de emergência e diminuição dos tombamentos de pós-emergência, quando relacionados com o tratamento testemunha. Estes resultados, desta forma, poderiam indicar um possível modo de ação do óleo essencial de *A. citriodora* em plântulas de feijão.

A ativação da atividade de glucanases em feijoeiro comum, por indutores abióticos e bióticos é relatada por diversos autores (DI PIERO; GARDA, 2008; KUHN; PASCHOLATTI, 2010; BORSATO et al., 2010).

As glucanases (β -1,3-glucanases) são enzimas líticas que hidrolisam as β -1,3-glucanas (PASCHOLATTI, 2011), que são as principais componentes da parede celular de oomicetos (MASSOLA JÚNIOR; KRUGNER, 2011), o que pode ter influenciado nos resultados obtidos no presente experimento.

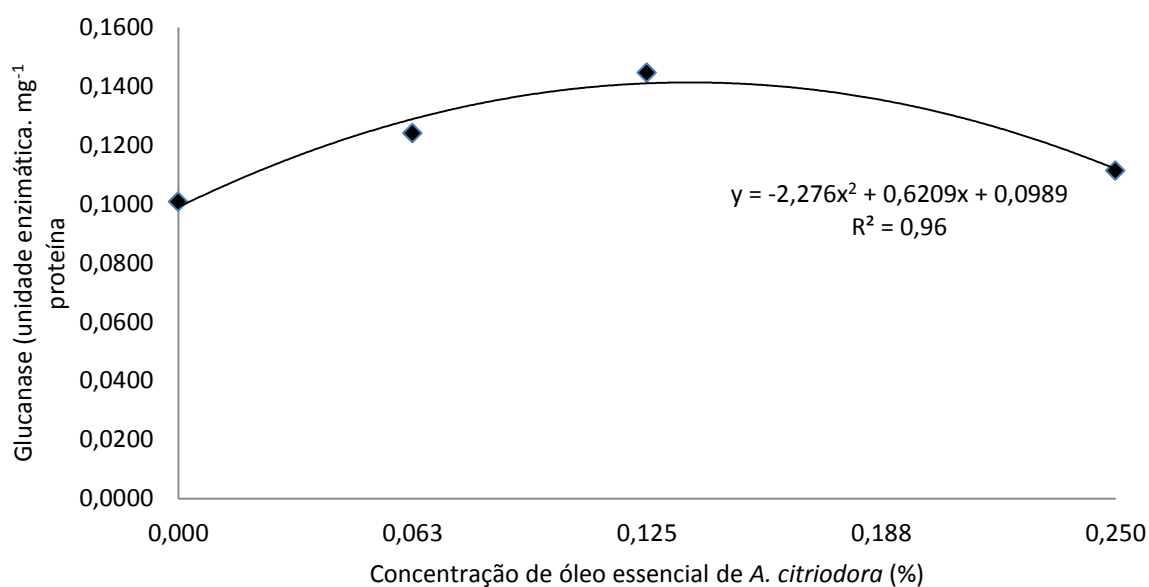


Figura 8: Atividade enzimática de β -1,3-glucanases em plântulas de feijão cv. Uirapuru, em substrato inoculado com *Pythium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, por nove dias, Pato Branco, PR, 2015.

3.6 CONCLUSÕES

O uso de óleo essencial de *A. citriodora* aplicado às sementes de feijoeiro proporcionou proteção às plântulas contra o tombamento de pré e de pós-emergência causado por *Pythium* sp., o que pode estar relacionado ao seu efeito fungistático e fungicida direto e também pela indução de mecanismos de resistência.

Os mecanismos de resistência evidenciados no trabalho, estão relacionados com o aumento da atividade de peroxidases e de β -1,3-glucanases, que possuem um importante papel no controle de oomicetos como o *Pythium* sp.

O óleo se mostrou fitotóxico, na concentração de 0,25%, a mais alta utilizada no trabalho. Em concentrações até 0,125% não houve problemas de germinação para as sementes.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARVAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; SANTHA KUMAR, T.R.; GUPTA, V.K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, n.1, p. 59-63, 2002.

ALI, H.F.M.; EL-BELTAGI, H.S.; NASR, N.F. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3044-3053, 2011.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

BEDENDO, I.P. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 22. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do Feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, L.E.A.; CAMARGO, J.A.M. **Manual de Fitopatologia 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. Cap. 37. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 333-349, 2005.

BORSATO, L.C.; DI PIERO, R.M.; STADNIK, M.J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.5, p. 318-322, 2010.

BOUCHRA, C.; MOHAMED, A.; MINA, I.H.; HMAMOUCI, M. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p. 251-256, 2003.

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

BRASIL, **Regras para análises de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399p.

CAMPOS, Â.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CARATTI, F.C.; LAMEGO, F.P.; RIGON, C.A.G.; FRIZON, D.; MAZON, M.; FABIANI, M.F. Efeito alelopático do extrato folhar de *Aloysia triphylla* sobre a germinação e o desenvolvimento de sementes de *Bidens subalternans* e *Euphorbia heterophylla*. **Anais... XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas na Era da Biotecnologia**. Campo Grande, MS, 2012.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

CTSBF – COMISSÃO TÉCNICA SUL BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na região sul brasileira**. 2 ed., Florianópolis: EPAGRI, 2012, 157p.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p. 1121-1128, 2008.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and

their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

GONÇALVES, A.H. Atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. no controle de fitopatógenos do feijoeiro comum. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFT, Gurupi, 2012, 90p.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. Rockville, v.62, p.31-35, 1978.

KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. **Tese (Doutorado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007, 140p.

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

LÓPEZ, A.G.; THEUMER, M.G.; ZYGADLO, J.A.; RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B₁ production in corn grain. **Mycopathologia**, v. 158, p. 343-349, 2004.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed., 2008, 544p.

LOZADA, B.S.; HERRERA, L.V.; PEREA, J.A.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronomica**, v. 61, n. 2, p. 94-102, 2012.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 149-206, 2011.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.23, p.1091-1101, 1972.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.6, p. 878-884, 2009.

MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap. 9, p. 139-152, 2009.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p. 49-85, 1994.

NEVES, M.C.P.; NEVES, J.F. **Agricultura Orgânica e Produção Integrada: diferenças e semelhanças**. Documentos 237, Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 20p., 2007.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KAHSIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; BAPAJI, M.; KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, p. 39-46, 1997.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G.A.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p. 372-379, 2013.

QUELI, R.; LAMEGO, F.P.; PERUZZO, S.T.; PAGLIARINI, I.B.; CARATTI, F.C. Potencial alelopático de *Aloysia triphylla*. **Anais... XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. Ribeirão Preto, SP, 2012.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fuzarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores: abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SBALCHEIRO, C.C.; DENARDIN, N.D.; BRAMMER, S.P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p. 29-37, 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45, 1996.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.2, p. 87-96, 2009.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. **Summa phytopathologica**, v.36, n.1, p. 73-80, 2010.

4. POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE PEPINO

4.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial do óleo de *Aloysia citriodora* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de pepino, com quatro experimentos. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito fungistático e fungicida de concentrações (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) do óleo essencial em meio BDA, mais a testemunha (meio BDA puro), no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, em placas de Petri com 8 cm de diâmetro. No segundo experimento avaliou-se o efeito do óleo essencial em concentrações (0,0625%; 0,125% e 0,25%) em meio de cultura BDA, mais a testemunha (BDA puro), no índice de velocidade de germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*. O terceiro experimento avaliou o efeito fitotóxico do óleo essencial de *A. citriodora*, quando aplicado nas sementes de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em rolo de papel (RP), em concentrações (0,0625%; 0,125% e 0,250%) mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%), e a testemunha (água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® a 0,5%). Avaliou-se pelas normas da RAS, a porcentagem de germinação, a massa verde e o tamanho de plântula, quatro e oito dias após incubação. No quarto experimento, avaliou-se o efeito do tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora*, nas mesmas concentrações testadas no terceiro experimento, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*. O inóculo do patógeno foi produzido em grãos de trigo e aplicado dez dias antes da semeadura das sementes de pepino. Avaliou-se neste experimento: porcentagem de emergência; tombamento de plântulas de pós-emergência; massa verde média por plântula; altura média de plântulas; e análises bioquímicas (teor de proteínas; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1.3-glucanases e quitinases). Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo tem potencial no controle do tombamento de plântulas, sendo o melhor resultado obtido na concentração de 0,0625%. Os mecanismos evidenciados ao controle estão relacionados ao seu efeito fungistático e fungicida direto e pela indução de mecanismos de defesa, principalmente pelo aumento da atividade bioquímica das peroxidases.

Palavras-chave: controle alternativo; *Cucumis sativus* L.; tratamento de sementes.

POTENTIAL OF *Aloysia citriodora* Palau OIL IN THE CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO AND IN THE RESISTANCE INDUCTION OF DAMPING OFF IN CUCUMBER

4.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the oil potential *Aloysia citriodora* in control of *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* and induction of resistance to cucumber damping off with four experiments. In the first experiment evaluated the effect fungistatic and fungicidal concentrations (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% and 0,500%) of essential oil on PDA, plus the control (means pure PDA), mycelial growth of *S. sclerotiorum*, in Petri dishes 8 cm in diameter. In the second experiment evaluated the effect of essential oil at concentrations (0,0625%; 0,125% and 0,25%) in PDA culture medium, plus the control (pure PDA), in miceliogenica germination speed index of *S. sclerotiorum*. The third experiment evaluated the phytotoxic effect of the essential oil of *A. citriodora* when applied in cucumber seeds cv. Wisconsin SMR 18, in paper roll (PR) at concentrations (0,0625%; 0,125% and 0,25%) plus adhesive spreader Tween 80® (0,5%) and the control (distilled water plus Tween 80® adhesive spreader 0,5%). Rewied by the rules of the RAS, the percentage of germination, the green mass and size of seedling, four and eight day after incubation. In the fourth experiment, we evaluated the effect of seed treatment with essential oil of *A. citriodora*, at the same concentration tested in the third experiment, inoculated on substrate *S. sclerotiorum*. The pathogen inoculum was produced in wheater grains and applied ten days before the sowing of the cucumber seeds. It was evaluated in this experiment: emergency percentage; post emergence damping off; medium green mass per plant; average height of seedlings; and biochemistry (protein content; enzymatic activity of peroxidases; phenylalanine ammonia liase (PAL); β -1,3-glucanases and chitinases). The experiments were conducted in a completely randomized design. The results showed that the oil has potential for damping off control, and the best result obtained at a concentration of 0,0625%. The mechanisms disclosed to the control are related to your fungistatic and fungicidal direct effect and the induction of defense mechanisms, mainly by increasing the biochemical activity of peroxidases.

Key-words: alternative control; *Cucumis sativus* L.; seeds treatment.

4.3 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que podem acometer a cultura do pepino em ambiente protegido, onde esta cultura é muito cultivada, estão as enfermidades causadas por *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005). Doenças causadas por fitopatógenos de solo como *S. sclerotiorum*, são muitas vezes responsáveis pelo abandono da estufa, pois os mesmos possuem estruturas de resistência que dificultam o seu controle (VIDA et al., 2004).

O fungo produz estruturas de resistência, os escleródios (BEDENDO, 2011), que ao germinarem de forma miceliogênica podem causar tombamentos em pré e pós-emergência em plântulas de pepino, enquanto que a germinação carpogênica do escleródio desenvolve a doença característica do mofo branco na parte aérea (ETHUR et al., 2005).

Não existem variedades resistentes a este tipo de doenças, então devem-se tomar medidas de controle que promovam o rápido desenvolvimento das plantas, rotação de culturas, evitar altas densidades, drenagem do solo e o tratamento térmico, biológico ou químico de sementes (BEDENDO, 2011).

O tratamento químico constitui-se em uma das principais medidas de controle de patógenos causadores de tombamento. Entretanto, de acordo com Schwan-Estrada (2009), o uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos, tem causado diversos problemas no ambiente, como por exemplo: contaminação de água, solos, animais e alimentos; intoxicação de agricultores; eliminação de microrganismos benéficos e o surgimento de resistência em fitopatógenos, insetos e plantas daninhas.

A agricultura sustentável se caracteriza por uma série de limitações a alguns métodos de controle, priorizando métodos culturais, biológicos, genéticos e físicos, excluindo assim os métodos químicos, ou seja, o uso de agrotóxicos (MICHEREFF et al., 2001). Em substituição do uso de agroquímicos, as plantas medicinais podem ser exploradas na obtenção de pesticidas naturais, pelo uso de seus extratos brutos e/ou óleos essenciais (MORAIS, 2009).

O potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, pode ocorrer tanto por sua ação fungitóxica direta (inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos), quanto pela indução de componentes de defesa vegetal, evidenciando seu caráter muitas vezes elicitador (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). De acordo com Smith (1996), elicitores são moléculas de qualquer origem, quer seja biótica ou abiótica, capazes de estimular respostas de defesa nas plantas.

A *Aloysia citriodora* Palau é uma espécie da família Verbenaceae, popularmente conhecida como cidró, cidró-pessegueiro, cidrão, erva-lúisa e cidrozinho. Trata-se de um arbusto grande, muito ramificado, ereto, com aroma de citral, porte de 2 a 3 metros de altura, nativo da América do Sul, provavelmente Chile, cultivado em jardins e hortas domésticas, no sul do Brasil, principalmente para fins medicinais e ocasionalmente como condimentar na culinária, para temperar saladas e recheios (LORENZI, 2008).

Esta espécie possui em seu óleo essencial, diversos componentes, como o geraniale, neral, limoneno (ARGYROPOULOU et al., 2007) e citral (ALI et al., 2011). Diversos trabalhos *in vitro* relatam o seu potencial antimicrobiano (ESCOBAR et al., 2010), antibacteriano (SARTORATTO et al., 2004; OHNO et al., 2003; DUARTE et al., 2007; ALI et al., 2011), e antifúngico (DUARTE et al., 2005; ALI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2004; COMBRINCK et al., 2011; LOZADA et al., 2012; BOUCHRA et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do uso de óleo essencial de *A. citriodora*, no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*, bem como na indução de resistência em plântulas de pepino a esta doença, pelo tratamento das sementes com este produto.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As plantas de *A. citriodora* foram cultivadas na Horta do Campus Dois Vizinhos da UTFPR. Para extração do óleo essencial das plantas, seguiu-se a metodologia descrita por Paulus et al. (2013) para a espécie. As plantas foram cortadas no mês de maio de 2014, no início da manhã e no estágio vegetativo em que se encontravam com 30 a 50 cm de altura. Uma excisada da espécie foi coletada e depositada no Herbário Botânico do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, onde foi realizada a identificação taxonômica pelo curador do herbário, sendo que o código do depósito foi registrado sob o número DVPR 842.

Logo após o corte, as folhas das plantas foram separadas e seccionadas em porções menores. Após, foram colocadas em aparelho de hidrodestilação, modelo Clevenger do Laboratório da Horta, para extração do óleo essencial.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitossanidade da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos. O isolado utilizado no trabalho foi obtido a partir de escleródios de *S. sclerotiorum* da micoteca do laboratório. O patógeno foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar), incubado em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, sendo repicado até a obtenção de colônias puras do fungo.

O primeiro experimento *in vitro* consistiu em avaliar o crescimento radial do patógeno em placas de Petri. Os tratamentos consistiram de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) mais a testemunha (água destilada), em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo considerada como repetição, cada placa de Petri utilizada.

O meio de cultura BDA utilizado no experimento foi esterilizado em autoclave, a temperatura de 120°C , por vinte minutos. O óleo essencial foi incorporado, após o resfriamento (temperatura em torno de 40°C) do meio de cultura, sendo em seguida, vertido em placas de Petri de 8 cm de diâmetro. Após, as placas foram esterilizadas abertas em câmara de fluxo laminar, com luz ultravioleta germicida por dez minutos.

O patógeno foi manipulado em câmara de fluxo laminar, sendo colocado no centro de cada placa, na forma de disco de micélio puro, com o diâmetro de 7 mm. Após as unidades experimentais foram fechadas e vedadas com papel filme plástico. Marcou-se com caneta de retroprojektor, nas tampas, os diâmetros A e B, de forma perpendicular, onde foram feitas as avaliações do crescimento radial dos fungos.

As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento, submetidas à temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de doze horas. O experimento foi encerrado quando a primeira placa foi atingida nas bordas pelo crescimento radial do fungo, tendo ocorrido isto em três dias (72 horas).

No segundo experimento *in vitro*, avaliou-se o índice de velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, em função de concentrações (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora*, diluído em meio BDA (batata dextrose) mais a testemunha, onde utilizou-se apenas o meio de cultura.

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento, sendo considerada como repetição uma placa de Petri com 8 cm de diâmetro, contendo dez escleródios por placa, oriundos de meio de cultura puro de *S. sclerotiorum*. As placas foram tampadas e lacradas com papel filme, sendo posteriormente acondicionadas em

câmara de crescimento, com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por oito dias. Avaliou-se diariamente a germinação miceliogênica dos escleródios. Os resultados foram expressos no índice de velocidade de germinação miceliogênica dos escleródios, aos oito dias.

TESTE DE FITOTOXIDEZ DO ÓLEO ESSENCIAL NAS SEMENTES

No terceiro experimento, realizado no Laboratório de Análise de Sementes da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, procedeu-se a avaliação do efeito do óleo essencial na germinação de sementes de pepino. Os tratamentos avaliados consistiram de concentrações (0,0625%, 0,125% e 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora* em água destilada, mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%). O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com cinco repetições.

Utilizaram-se sementes de pepino para conserva, da cv. Wisconsin SMR 18, da ISLA Sementes, produzidas na safra 2014. O poder germinativo das sementes era de 97% e possuíam 100% de pureza. As sementes passaram por beneficiamento pós-colheita da empresa produtora, no entanto, não receberam tratamento químico comercial.

Antes de receberem os tratamentos com óleo essencial, as sementes foram previamente desinfestadas por cinco minutos em imersão em água destilada com hipoclorito de sódio a 5%. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas em água destilada e colocadas em papel absorvente para secagem. Os tratamentos foram aplicados nas sementes em embalagens plásticas transparentes até obtenção de mistura uniforme. Utilizou-se 10 mL de cada tratamento, para tratar cada repetição de 100 sementes.

Avaliou-se a percentagem de germinação de acordo com as Regras para Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), com quatro repetições de cem sementes. Foram realizadas contagens aos quatro e aos oito dias após a implantação dos testes. Utilizou-se o substrato de rolo de papel para germinação de sementes (RP), umedecidos 2,5 vezes sua massa com água destilada. Após a montagem, o teste de germinação foi conduzido em câmara germinadora modelo Mangelsdorf, na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$. A reposição de água foi realizada mediante constatação visual de reumedecimento do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O comprimento de plântulas e massa fresca de plântulas foi realizado de acordo com metodologia proposta por Nakagawa (1994), com cinco repetições de 20 sementes, colocadas para germinar em RP no interior de câmara germinadora modelo Mangelsdorf. Aos

nove dias, com o uso de papel milimetrado, procedeu a medição da parte aérea e de raízes das plântulas germinadas, sendo o resultado expresso em milímetros por plântula.

A determinação da massa de matéria fresca de plântulas foi conduzida conjuntamente com o teste de comprimento de plântulas. Após a medição das plântulas, realizou a pesagem individual das mesmas e o resultado foi expresso em gramas por plântula.

TESTE EM SUBSTRATO INOCULADO COM O PATÓGENO

O quarto trabalho foi realizado na Câmara de Crescimento do Laboratório de Fitossanidade do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, onde avaliou-se o efeito do óleo essencial no tratamento de sementes, no desenvolvimento das plântulas e na proteção contra o tombamento de plântulas, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*. Os tratamentos utilizados foram concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0625%; 0,125% e 0,250%) em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%), em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições.

Cada unidade experimental consistiu de bandejas de isopor, com dimensão de 70 X 40 X 6 cm. Estas possuíam cem células cada, com dimensão de 35 X 35 mm na parte superior e 10 X 10 mm na cavidade inferior e altura de 60 mm. Cada célula recebeu substrato inoculado com micélio de *S. sclerotiorum* e uma semente de pepino.

As sementes utilizadas foram da mesma procedência do experimento em RP anterior. Os procedimentos para desinfecção das sementes, bem como o tratamento destas com o óleo essencial, também seguiram os mesmos procedimentos do experimento em RP.

O substrato utilizado no experimento foi da marca Tecnomax® para horticultura, contendo casca de pínus, casca de arroz carbonizada, carvão vegetal e vermiculita, compostadas e carbonizadas. Realizou-se a desinfecção do substrato em autoclave por quarenta minutos a 120°C.

O inóculo de *S. sclerotiorum* utilizado no experimento foi proveniente das placas de Petri utilizadas como testemunha no experimento inicial, o qual foi misturado a grãos de trigo autoclavados, em embalagens plásticas, contendo meio quilo do cereal. Estas embalagens permaneceram em câmara de crescimento a 24°C±1°C e fotoperíodo de 12 horas por 60 dias, quando os patógenos haviam colonizado todo o substrato.

Após, os grãos de trigo miceliados com o inóculo, foram misturados ao substrato autoclavado, na quantidade de 20g. Kg⁻¹. O substrato inoculado com o patógeno foi

colocado nas bandejas de isopor, onde foi deixado por dez dias antes da semeadura do pepino, com irrigações diárias, com a finalidade de adaptar o patógeno ao máximo às condições do experimento.

As sementes, logo após terem sido tratadas com o óleo essencial, foram semeadas nas bandejas com os substratos infestados. As células então foram umedecidas e colocadas na Câmara de Crescimento, à temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $65\%\pm 10\%$ de umidade relativa, por oito dias. As células foram umedecidas sempre que necessário, evitando a dessecação.

Foram realizadas duas avaliações, de acordo com a Regra de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo a primeira aos quatro dias e a segunda, aos oito dias após a implantação dos testes. As quatro dias, realizou-se a contagem de sementes emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem de emergência.

Na segunda avaliação, realizou-se a contagem de sementes emergidas e de plântulas com tombamento de pós-emergência. Após, as plântulas foram retiradas com cuidado das células, evitando a sua quebra, lavadas em água corrente e dispostas sobre papel absorvente para secagem. Em seguida, procedeu-se a mensuração do comprimento das plântulas em papel milimetrado e a pesagem em balança analítica para obter a massa fresca. Os resultados da avaliação realizada aos oito dias foram expressos em porcentagem de emergência, porcentagem de tombamentos de plântulas em pós-emergência, comprimento médio de plântulas e massa fresca média por plântula.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS TECIDOS VEGETAIS

Ao final do quarto experimento, separou-se material vegetal mixto com raízes e parte aérea das plântulas de pepino, que foram lavadas, picadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -20°C até as avaliações bioquímicas. As avaliações bioquímicas realizadas foram as seguintes: teor de proteínas totais; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1,3-glucanases e quitinases.

O teor de proteínas totais foi avaliado utilizando-se o método descrito por Bradford (1976), onde as amostras foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 RPM por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante obtido do processo foi coletado e levado para leitura em espectrofotômetro a 630 nm, com soro albumina bovina como padrão.

A quantificação da atividade das peroxidases foi adaptada do método descrito por Matsuno e Uritani (1972). As amostras de tecido vegetal, com peso médio de 0,260 g, foram maceradas em almofariz gelada, e então, adicionou-se 5 mL de solução extratora – tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Após, foram colocados 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma); e o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 4.000 RPM em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático.

A análise de atividade da enzima peroxidase foi realizada por meio dos seguintes passos: em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0), 0,5 mL de água oxigenada a 3%, 0,5 mL de guaiacol 0,5% e 3,0 mL da amostra extraída do tampão pH 7. Esta mistura foi levada para incubação em banho-maria, por 15 minutos, a 30°C.

Após incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de bissulfito de sódio. As leituras foram realizadas após 10 minutos de repouso, em espectrofotômetro, em comprimento de ondas de 450 nm.

Para avaliação da enzima FAL, as amostras foram transferidas e maceradas em almofariz previamente gelado, onde se acresceu 6,0 mL do tampão de extração a 4°C, o qual foi preparado com mistura de 22,2 g de Tris (Tri hidroximetil-aminometano); 0,37 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP (polivinilpirrolidona), completando-se o volume para 1000 mL com água destilada e ajustando-se o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N.

Após a maceração em solução tampão, as amostras foram centrifugadas a 6000 RPM por 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi diluído pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração.

A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Pipetou-se 1,5 mL de cada extrato enzimático em tubos de ensaio, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg. mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”.

Incubou-se a 40°C por uma hora a mistura, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras em espectrofotômetro, modelo NT-805 NOVATÉCNICA, a 290 nm (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).

Para dosagem das atividades de quitinase e β-1,3-glucanase, as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação

(20.000 RPM por 25 min, a -4°C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada pela liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. Para a determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos será utilizado como substrato solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg mL^{-1} , LoeweBiochemicaGmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo et al. (1996).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, primeiramente verificando a normalidade dos dados com o Teste de Lilliefors. Os dados com distribuição normal foram submetidos à análise de variância e análise de regressão quando necessário. Os dados que não possuíam distribuição normal, verificou-se a possibilidade de transformação dos dados para nova análise de variância. Na impossibilidade de avaliar com os dados transformados, procedeu-se a comparação entre os tratamentos, pelo desvio padrão da média.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi afetado negativamente pelo uso de óleo essencial de *A. citriodora* no meio BDA, sendo observado que mesmo na menor concentração, houve diferença significativa quando comparado com a testemunha. Observou-se também efeito fungicida nas concentrações de 0,125%, 0,25% e 0,5% de óleo essencial (Figura 9).

O potencial antifúngico do óleo essencial de *A. citriodora* observado neste trabalho em baixas concentrações, é relatado também por Lozada et al. (2012). Estes autores observaram que a utilização de óleo essencial desta espécie e de outras espécies de *Aloysia*, em teste *in vitro*, reduziu o crescimento do fungo *Moniliophthora roreri*, causador de monilíose em cacau, na dosagem de 0,2% e causou inibição total do micélio do patógeno, nas concentrações de 0,8% a 1%.

Combrinck et al. (2011), verificaram que a concentração mínima necessária de óleo essencial de *A. citriodora* para inibir 100% do crescimento micelial *in vitro*, dos patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* do abacate e da manga, *Alternaria citrii* de laranjas, *Botrytis cinerea* de uvas foi de 0,2%, e para *Penicillium digitatum* de laranjas e *Lasiodiopodia theobramae* de mangas foi de 0,3%.

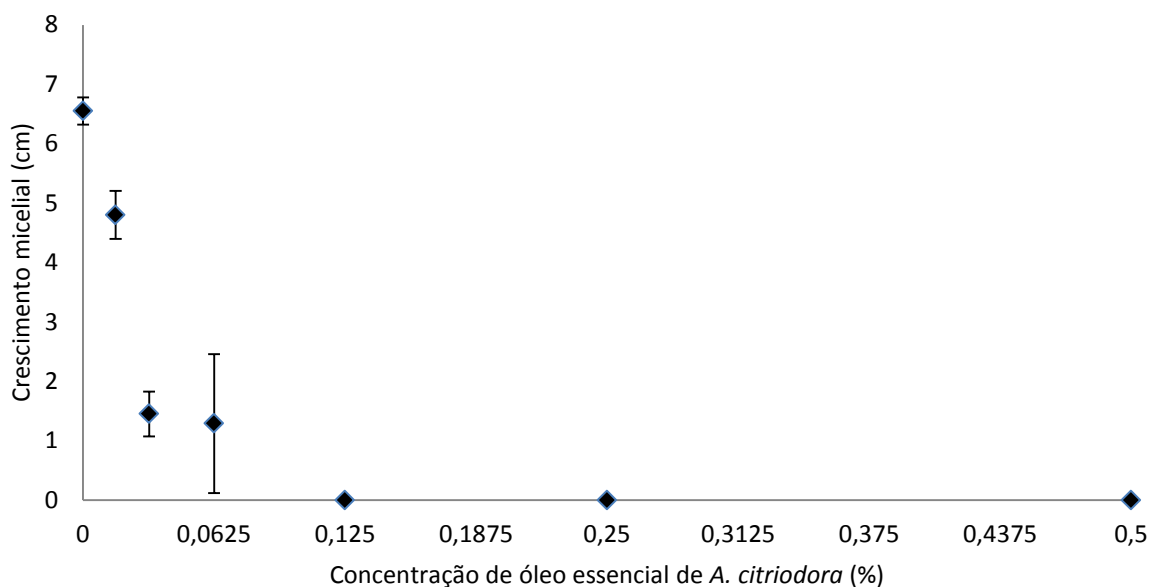


Figura 9: Crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, 72 horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015. Barras verticais representam o desvio padrão da média.

Bouchra et al. (2003), relataram que na concentração de 0,025% em meio BDA, o óleo essencial desta planta reduziu o crescimento micelial *in vitro*, nas taxas de 69,4% para *B. cinerea*, 68,2% para *Phytophthora citriophthora*, 44,4% para *Penicillium digitatum* e em 40,4% para *Geotrichum citri-aurantii*. E significativa redução do crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium verticillioides* foi observado por López et al. (2004), nas faixas de concentração em meio de cultura entre 0,025% a 0,05%.

A germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* também foi afetada *in vitro* pelas concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*. Observou-se efeito linear decrescente com o aumento da concentração testada, chegando a ter uma total redução ou efeito 100% fungicida na concentração de 0,25%, observado pelo cálculo do seu índice de velocidade de germinação (Figura 10).

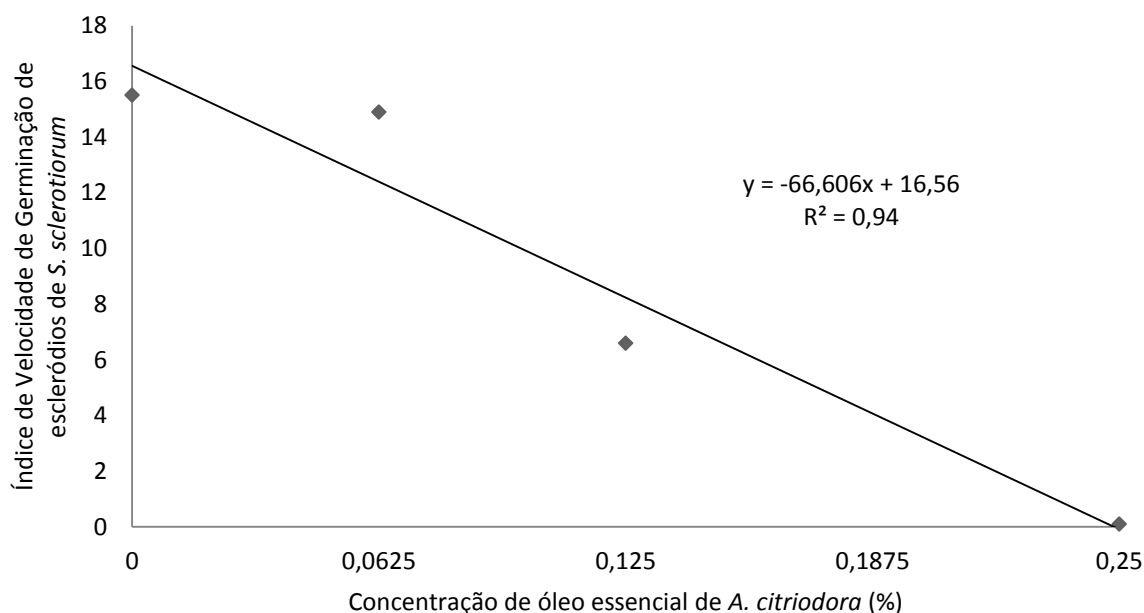


Figura 10: Índice de velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA, oito dias após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no escuro, Pato Branco, PR, 2015.

Paulus et al. (2013), estudando a composição química do óleo essencial de *A. citriodora*, para as mesmas condições de local, solo, estágio vegetativo, mês do ano, horário de coleta e método de extração, encontraram como principais componentes, o limoneno (14,10%) e o citral (geranial + neral) (49,69%).

O limoneno presente em óleos essenciais das plantas *Mentha spicata* e *Anethum sowa*, também é relatado com efeito antifúngico a vários patógenos humanos (AGGARWAL et al., 2002).

Extraído de citronela (*Cymbopogon citratus*), o citral é relatado com potencial de controle a várias espécies de fungos, como *Candida albicans*, *Alternaria citrii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Helminthosporium compactum*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichophyton mentagrophytes* (PATTNAIK et al., 1997) e *Rhizoctonia solani* (GONÇALVES, 2012). Oriundo de *Lippia alba*, este composto teve atividade antifúngica a *A. fumigatus* e *Candida krusei* (MESA-ARANGO et al., 2009).

O óleo essencial de *A. citriodora* exerceu efeito fungistático e fungicida ao fungo testado no trabalho, no entanto, no teste de germinação em RP, comprovou-se que o

mesmo, nas concentrações testadas, não demonstrou ter efeito fitotóxico na porcentagem de germinação e na massa verde média por plântula de pepino (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de germinação e massa verde média de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$, no escuro, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Germinação (%)	Massa verde média por plântula (g)
0,0000	99,8 ns	0,212 ns
0,0625	100,0	0,225
0,1250	100,0	0,238
0,2500	99,6	0,231

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Com relação à altura de plântulas de pepino, testado em papel germiteste em função de concentrações do óleo essencial de *A. citriodora* aplicado nas sementes, observou-se incremento da variável, tendo ponto de máximo, na concentração de 0,104%. Entretanto, observou-se efeito fitotóxico, com diminuição do crescimento em altura das plântulas, quando utilizou-se o tratamento das sementes com concentrações acima de 0,207% de óleo essencial (Figura 11).

Caratti et al. (2012) observaram efeito fitotóxico de extratos brutos aquosos de *A. citriodora*, sobre as plantas daninhas *Bidens subalternans* e *Euphorbia heterophylla*, inibindo sua germinação e menor comprimento da radícula. Queli et al. (2012) também observaram este efeito, aumentando o tempo de germinação de sementes de alface e picão-preto (*Bidens pilosa*), quando comparadas ao tratamento controle.

Em substrato contaminado com micélio de *S. sclerotiorum*, a porcentagem de emergência de plântulas de pepino aos quatro e nove dias, a massa verde média por plântula e o comprimento médio de plântulas de pepino, não foram influenciados significativamente pelo tratamento das sementes com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (Tabela 5).

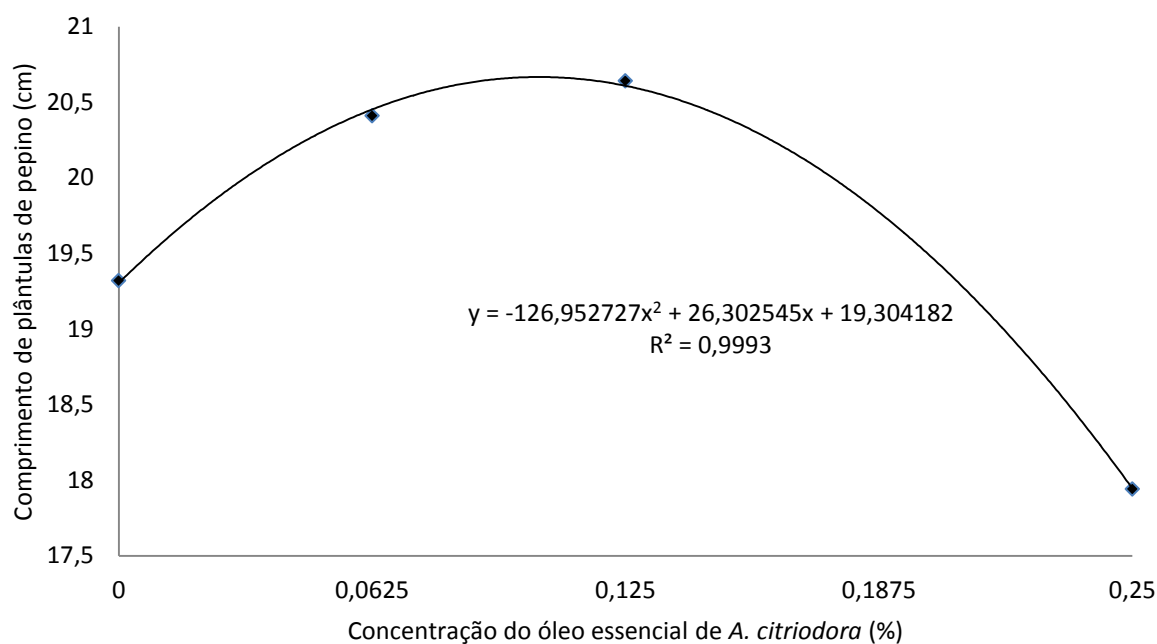


Figura 11: Comprimento médio por plântula de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$, no escuro, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Tabela 5: Porcentagem de emergência aos quatro e oito dias, massa verde média por plântula e comprimento de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Emergência – 4° dia (%)	Emergência – 8° dia (%)	Massa verde média por plântula (g)	Comprimento médio por plântula (cm)
0,0000	96,0 ns	96,0 ns	0,54 ns	15,23 ns
0,0625	100,0	100,0	0,50	15,30
0,1250	95,0	96,0	0,54	15,59
0,2500	97,0	97,0	0,52	16,12

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Com relação ao tombamento de plântulas de pepino em pós-emergência, o uso de óleo essencial de *A. citriodora* diminuiu a ocorrência com relação à testemunha, no

entanto, somente o tratamento das sementes com 0,0625% foi estatisticamente significativo (Figura 12). Este resultado corrobora com os resultados obtidos no teste de germinação em RP, onde o maior comprimento de plântulas foi observado concentração de 0,104%, ou seja, próximo a 0,0625%. Nas maiores concentrações, o óleo essencial pode ter causado efeito fitotóxico nas plântulas, tornando-as mais suscetíveis ao patógeno.

Com relação às análises bioquímicas realizadas nos tecidos vegetais das plântulas de pepino, observou-se que o teor de proteínas foi influenciado pelas concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* testadas no tratamento das sementes (Figura 13). Não houve diferenciação dos tratamentos com a testemunha, no entanto, o tratamento das sementes com 0,0625% de óleo essencial foi estatisticamente superior ao tratamento de maior dosagem (0,25%) (Figura 13), o que também pode estar relacionado com os resultados obtidos com a fitotoxidez e tombamentos de plântulas de pós-emergência (Figuras 11 e 12).

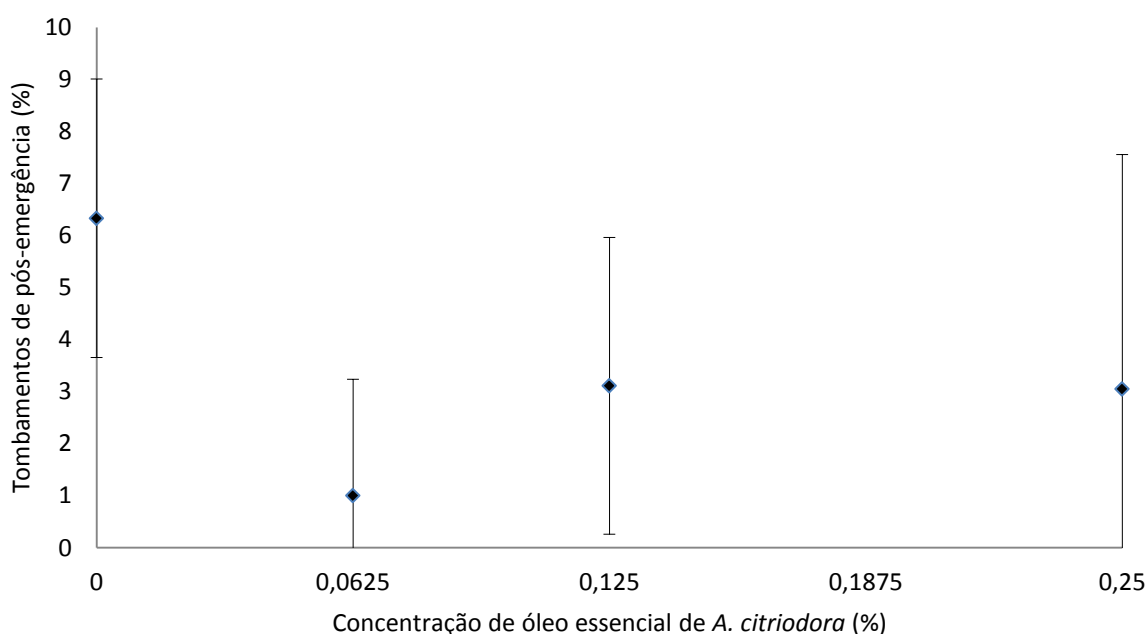


Figura 12: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Mesmo não havendo uma proteção efetiva das plantas contra o *damping off*, a atividade de peroxidases foi influenciada pelo tratamento das sementes com óleo essencial de

A. citriodora, todas as concentrações tiveram resultado superior ao encontrado na testemunha (Figura 14), o que é de suma importância na defesa das plântulas ao tombamento causado por patógenos. A ativação de peroxidases em pepino, eliciada por extratos brutos aquosos e óleos essenciais extraídos de plantas, é relatada por Franzener et al. (2011).

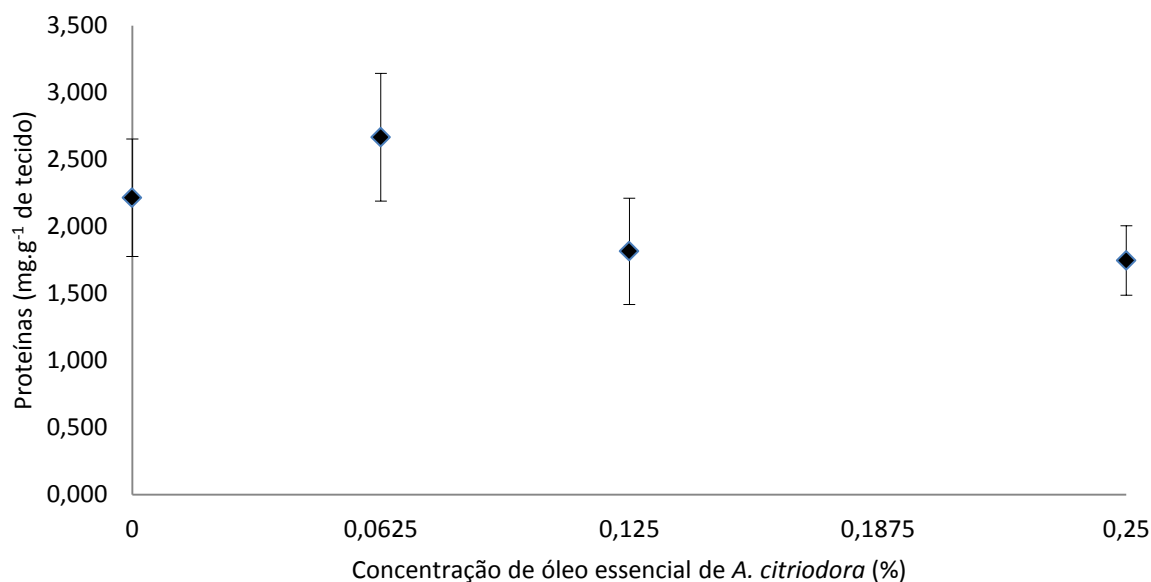


Figura 13: Teor de proteínas dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

A formação de espécies ativas de oxigênio, também chamada de explosão oxidativa, é uma das respostas mais rápidas de defesa vegetal após o reconhecimento do patógeno, atuando no reforço da parede celular, pela ligação cruzada de proteínas estruturais ou de componentes fenólicos, formando uma barreira mecânica efetiva e de forma direta como agente antimicrobiano (RESENDE et al., 2003). Além de participar ativamente no controle de fitopatógenos, as peroxidases de acordo com Pinto et al. (2011), podem atuar em vias de sinalização de rotas de defesa vegetal.

A atividade bioquímica da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) não foi influenciada significativamente pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 15). Stangarlin et al. (2011) relatam que a FAL, juntamente com a peroxidase, são consideradas enzimas chave de defesa vegetal, entre o metabolismo primário e o secundário, sendo que a primeira é importante na formação dos compostos fenólicos.

Como exemplo de compostos fenólicos que tem como precursor a FAL, tem-se as cumarinas, ligninas, taninos, flavonoides e isoflavonóides (GARCIA; CARRIL, 2009).

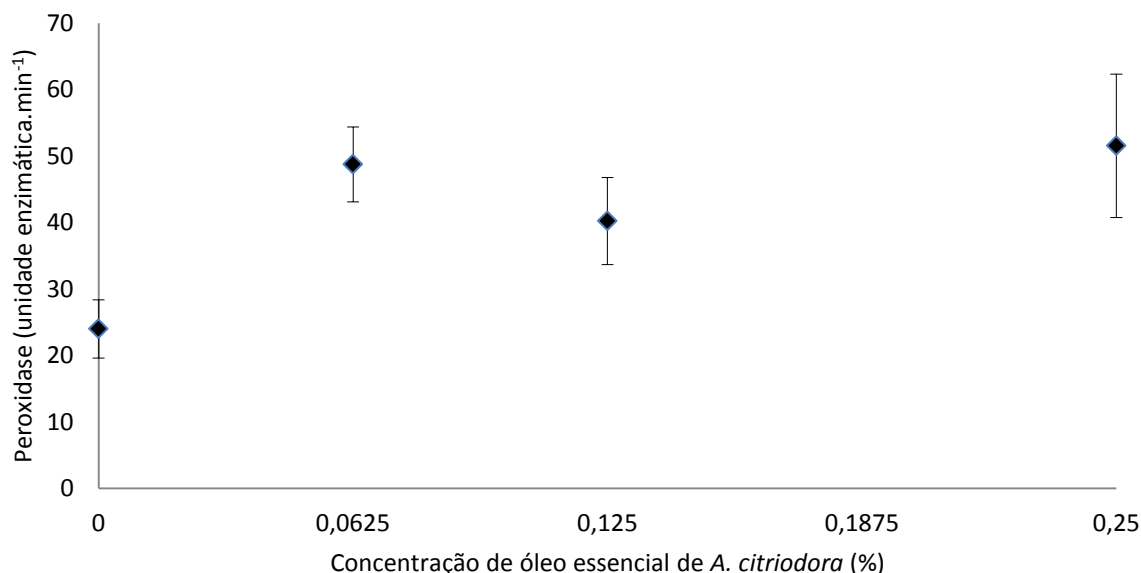


Figura 14: Atividade enzimática de peroxidases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Para o controle de tombamentos de plântulas, a formação de lignina é de suma importância, pois a mesma está relacionada com a maturação dos tecidos do vegetal. De acordo com Bedendo (2011), uma das medidas de controle desse tipo de doença, é a promoção do rápido desenvolvimento da plântula, com maturação dos tecidos jovens, que passam dessa forma a serem resistentes.

A atividade enzimática de quitinases nos tecidos vegetais das plântulas de pepino, não foi influenciada de forma significativa pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora*, pois com o uso do mesmo, não houve diferença estatística quando comparado à testemunha (Figura 16).

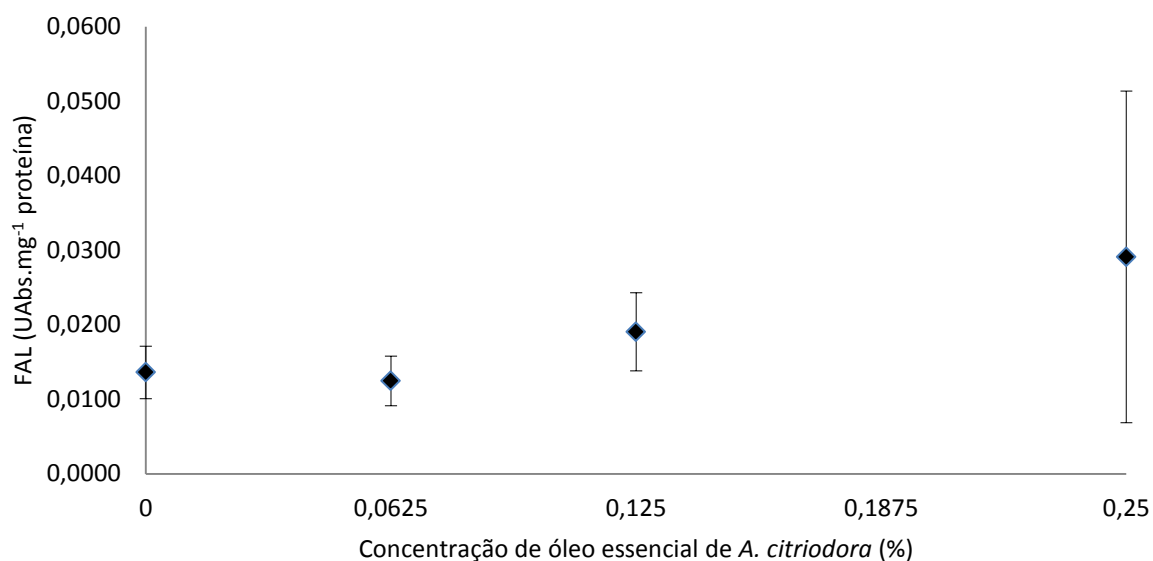


Figura 15: Atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

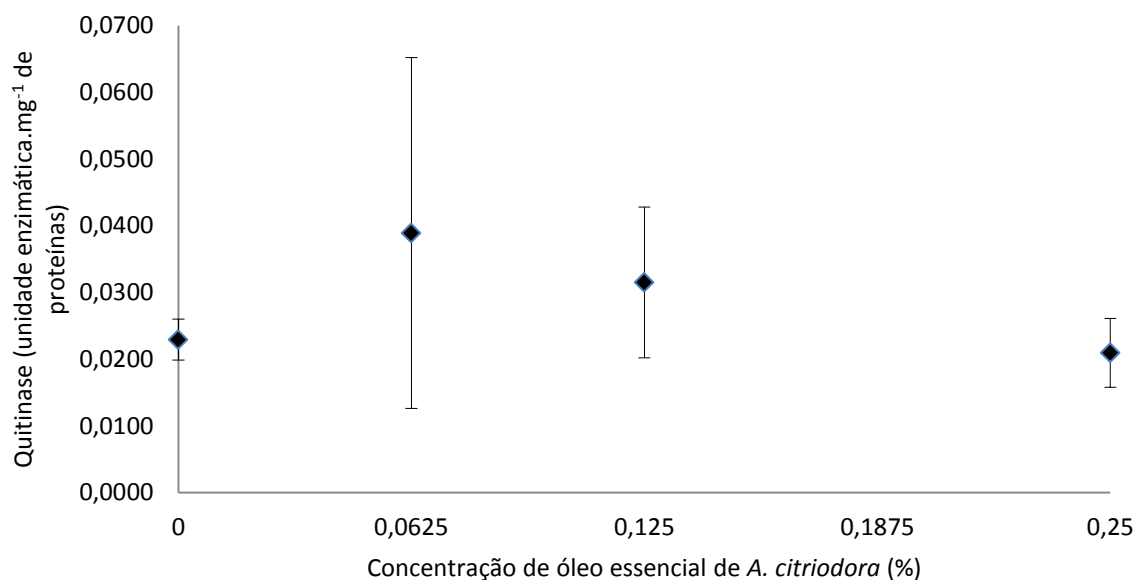


Figura 16: Atividade enzimática de quitinases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

Já a atividade enzimática de β -1,3-glucanases foi influenciada pelo tratamento das sementes com *A. citriodora*, sendo que, nos tratamentos com concentração de 0,125% e 0,25%, o resultado foi superior ao obtido no tratamento controle (Figura 17).

De acordo com Massola Júnior e Krugner (2011), *S. sclerotiorum*, é um fungo verdadeiro, e assim como os quais, possuem em suas paredes celulares, β -glucanas e quitina. B-1,3-glucanases são enzimas líticas, que possuem potencial para hidrolisar as β -glucanas presentes na parede celular de fungos, classificadas como “Proteínas Relacionadas à Patogênese” (Proteínas-RP) (PASCHOLATI, 2011).

Pesquisas têm relacionado o uso de indutores de enzimas líticas como a glucanase em tecidos vegetais, no controle de *S. sclerotiorum*, como em canola (FERNANDO et al., 2007) e em alcachofra (MARCUCCI et al., 2010).

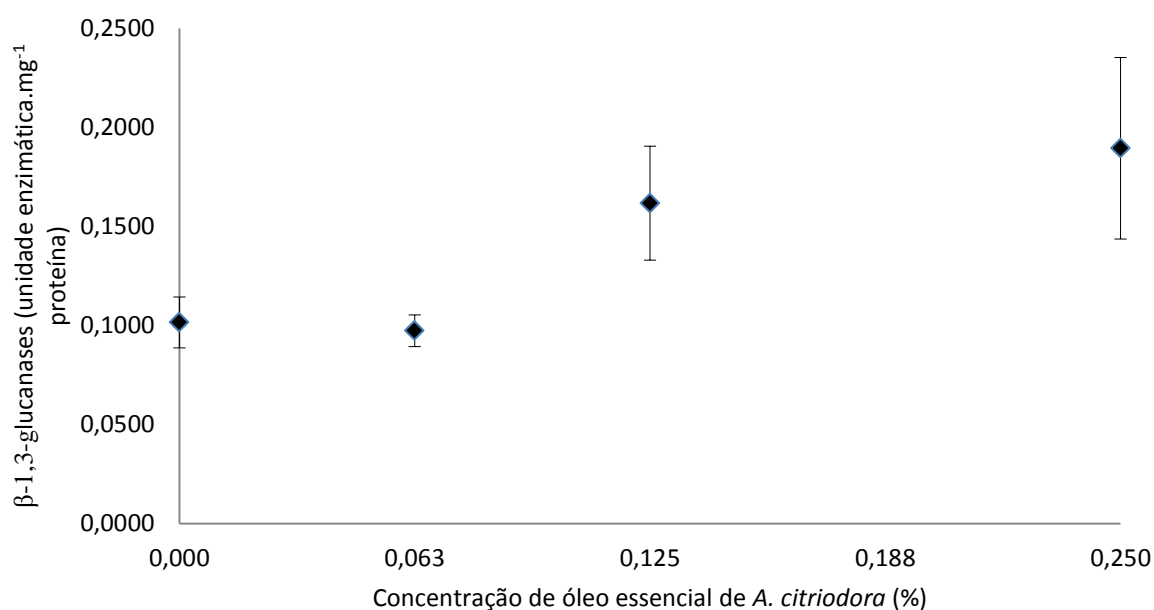


Figura 17: Atividade enzimática de β -1,3-glucanases dos tecidos vegetais de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias, Pato Branco, PR, 2015.

4.6 CONCLUSÕES

O uso do óleo essencial no tratamento de sementes de pepino, colaborou na redução da incidência de tombamentos de pós-emergência em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*. Na concentração de 0,0625%, esta variável foi significativamente superior a testemunha, o que pode estar atribuído à atividade fungistática ou fungicida direta, observados no teste *in vitro*.

A redução dos tombamentos pode também estar atrelada aos mecanismos de defesa ativadas nas plântulas de pepino. Os mecanismos de defesa vegetal ativados no presente trabalho, estão relacionados com o aumento da atividade das enzimas peroxidase e β -1,3-glucanases.

Nas concentrações acima de 0,0625% testadas, os tombamentos de pós-emergência não diferiram dos resultados obtidos no tratamento testemunha, o que pode estar relacionado com a fitotoxidez observada nas plântulas em teste de germinação em RP. Neste teste, observou-se redução do comprimento das plântulas, em comparação com a testemunha, nos tratamentos das sementes de pepino com concentrações acima de 0,104% de óleo essencial de *A. citriodora*.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARVAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; SANTHA KUMAR, T.R.; GUPTA, V.K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, n.1, p. 59-63, 2002.

ALI, H.F.M.; EL-BELTAGI, H.S.; NASR, N.F. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3044-3053, 2011.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

BEDENDO, I.P. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 22. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BOUCHRA, C.; MOHAMED, A.; MINA, I.H.; HMAMOUCI, M. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p. 251-256, 2003.

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

BRASIL, **Regras para análises de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399p.

CARATTI, F.C.; LAMEGO, F.P.; RIGON, C.A.G.; FRIZON, D.; MAZON, M.; FABIANI, M.F. Efeito alelopático do extrato folhar de *Aloysia triphylla* sobre a germinação e o desenvolvimento de sementes de *Bidens subalternans* e *Euphorbia heterophylla*. **Anais... XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas na Era da Biotecnologia**. Campo Grande, MS, 2012.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; DA ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FERNANDO, W.G.D.; NAKEERAN, S.; ZHANG, Y.; SAVCHUK, S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection**, v.26, n.2, p. 100-107, 2007.

FRANZENER, G.; MOURA, G.S.; MEINERZ, C.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extrato aquoso de *Corymbia citriodora* no controle alternativo da antracnose em pepino e do cretamento bacteriano em feijão. **Cadernos de Agroecologia**, v.6, n.2, p. 1-5, 2011.

GARCIA, A.Á.; CARRIL, E.P.-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia)**, v.2, n.3, p. 119-145, 2009.

GONÇALVES, A.H. Atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. no controle de fitopatógenos do feijoeiro comum. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFT, Gurupi, 2012, 90p.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F., Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. Rockville, v.62, p.31-35, 1978.

LÓPEZ, A.G.; THEUMER, M.G.; ZYGADLO, J.A.; RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B₁ production in corn grain. **Mycopathologia**, v. 158, p. 343-349, 2004.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed., 2008, 544p.

LOZADA, B.S.; HERRERA, L.V.; PEREA, J.A.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronomica**, v. 61, n. 2, p. 94-102, 2012.

MARCUCCI, E.; ALEANDRI, M.P.; CHILOSI, G.; MAGRO, P. Induced resistance by β -Aminobutyric aci in artichoke against white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Phytopathology**, v.158, n.10, p. 659-667, 2010.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 149-206, 2011.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissui injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.23, p.1091-1101, 1972.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, citotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.6, p. 878-884, 2009.

MICHEREFF, S.J.; PERUCH, L.A.M.; ANDRADE, D.E.G.T. Manejo sustentável de doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**, Recife: UFRPE, Cap. 2, p. 15-70, 2001.

MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap. 9, p. 139-152, 2009.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p. 49-85, 1994.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KAHSIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G.A.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p. 372-379, 2013.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; BAPAJI, M.; KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, p. 39-46, 1997.

PINTO, M.S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.2, p. 241-248, 2011.

QUELI, R.; LAMEGO, F.P.; PERUZZO, S.T.; PAGLIARINI, I.B.; CARATTI, F.C. Potencial alelopático de *Aloysia triphylla*. **Anais... XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. Ribeirão Preto, SP, 2012.

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

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fuzarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores: abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p. 4038-4045, 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45, 1996.

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

VIDA, J.B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D.J.; BRANDÃO FILHO, J. USAN T.; VERZIGNASSI, J.R.; CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p. 355-372, 2004.

5. POTENCIAL DO ÓLEO DE *Aloysia citriodora* Palau NO CONTROLE DE *Fusarium* sp. IN VITRO E NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO TOMBAMENTO DE PLÂNTULAS DE BETERRABA

5.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal, avaliar o potencial do óleo essencial de *Aloysia citriodora* no controle de *Fusarium* sp. *in vitro* e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de beterraba, o qual foi realizado na UTFPR, Campus Dois Vizinhos, com quatro experimentos. O primeiro e o segundo experimento foram realizados *in vitro*, em meio de cultura BDA e BD respectivamente, em delineamento inteiramente ao acaso, com o objetivo de avaliar o efeito fungistático e fungicida de concentrações do óleo essencial de *A. citriodora*, no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Fusarium* sp. O terceiro experimento avaliou se o óleo essencial de *A. citriodora* apresenta efeito fitotóxico, quando aplicado nas sementes de beterraba cv. Maravilha, em teste de germinação em RP, em concentrações (0,0625%; 0,125%; 0,250%, mais espalhante adesivo Tween 80® a 0,5%) mais a testemunha (água destilada mais Tween 80® a 0,5%). Este experimento foi conduzido em câmara de germinação, em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições, sendo considerado como unidade experimental, um RP com cem sementes. Avaliou-se pelas normas da RAS, a porcentagem de germinação, a massa verde e o tamanho de plântula, quatro e quatorze dias após incubação. No quarto experimento, avaliou-se o efeito do tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora*, nas mesmas concentrações testadas no terceiro experimento, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., em delineamento inteiramente ao acaso, sendo considerada como unidade experimental, uma bandeja com vinte células, com uma semente por célula. Avaliou-se neste experimento: porcentagem de emergência; tombamento de plântulas de pós-emergência; massa verde média por plântula; comprimento médio de plântulas; e análises bioquímicas (teor de proteínas; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1,3-glucanases e quitinases). Os resultados obtidos demonstraram que o óleo tem efeito fungistático e fungicida no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Fusarium* sp.; não apresenta fitotoxidez, favorecendo inclusive o comprimento de plântulas com o aumento da concentração; no entanto não controlou de forma significativa os tombamentos de pós-emergência causados por *Fusarium* sp.; más mesmo assim, os resultados são promissores, pois o uso do óleo de *A.*

citriodora ativou os mecanismos de defesa vegetal, pelo aumento da atividade enzimática de peroxidases.

Palavras-chave: controle alternativo; *Beta vulgaris* L.; tratamento de sementes.

POTENTIAL OF *Aloysia citriodora* Palau OIL IN THE CONTROL OF *Fusarium* sp. IN VITRO AND IN THE RESISTANCE INDUCTION OF BEET DAMPING OFF

5.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect the essential oil *Aloysia citriodora* in control of *Fusarium* sp. in vitro and in induce resistance to beet seedlings damping off, which was conducted in UTFPR, Campus Dois Vizinhos, with four experiments. The first and second experiment were performed in vitro, in PDA culture medium and PD respectively, in a completely randomized design, in order to assess the fungistatic and fungicidal effect of essential oil of *A. citriodora*, mycelial growth and conidia germination of *Fusarium* sp. The third experiment is the essential oil of *A. citriodora* presents phytotoxic effects when applied in beet seed cv. Wonder, in germination test in RP, at concentrations (0,0625%; 0,125%; 0,25%, more spreader Tween 80® adhesive 0,5%) plus the control (distilled water plus Tween 80® 0,5%). This experiment was conducted in germination chamber, in a completely randomized design, with five repetitions, being considered as an experimental unit, a PR with a hundred seeds. Rewied by the rules of the RAS, the germination percentage, the green mass and size of seedlings, four and fourteen days after incubation. In the fourth experiment, we evaluated the effect of the seed treatment with essential oil from *A. citriodora*, at the same concentrations tested in the third experiment, in inoculated substrate with *Fusarium* sp., in a completely randomized design, being considered as an experimental unit, a tray with twenty cells, with one seed per cell. It was evaluated in this experiment: emergency percentage; post emergence damping off; medium green mass per plant; average height of seedlings; and biochemistry (protein content; enzymatic activity of peroxidases; phenylalanine ammonia liase (PAL); β -1,3-glucanases and chitinases). The results showed that the oil has fungistatic and fungicidal effect on mycelial growth and conidia germination of *Fusarium* sp.; shows no phytotoxicity, including promoting the seedling length with increasing of concentration; however it failed to control significantly the post-emergence damping off caused by *Fusarium*

sp.; bad even then, the results are promising, since the use of *A. citriodora* oil activated the mechanisms of plant defense, increased enzyme activity of peroxidases.

Key-words: alternative control; *Cucumis sativus* L.; seeds treatment.

5.3 INTRODUÇÃO

Diversas doenças podem afetar a cultura da beterraba, entre elas o *damping off*, caracterizado por lesões deprimidas nos tecidos vegetais, que provocam o fendilhamento ou constrição do caule, podendo levar ao tombamento da plântula (MAZARO et al., 2009).

O tombamento de plântulas em beterraba a campo geralmente aparece em reboleiras, e pode ser causado por espécies do gênero *Fusarium*, com maior ou menor intensidade, dependendo dos seguintes fatores: histórico de cultivo da área; má drenagem e compactação do solo; alta umidade do solo; altas densidades de plantio; cultivos sucessivos e temperaturas entre 15 e 25°C (TIVELLI et al., 2011).

Devido ao fato de não existirem variedades resistentes para o controle de tombamento de plântulas, devem-se tomar medidas que promovam o seu rápido desenvolvimento, uso de rotação de culturas, evitar altas densidades de plantio, drenar o solo e o tratamento térmico, biológico ou químico de sementes (BEDENDO, 2011), sendo este último uma das principais medidas utilizadas.

Entretanto, com relação ao uso de agroquímicos, a sociedade tem demandado produtos orgânicos isentos de pesticidas, buscando melhor qualidade alimentar (NEVES; NEVES, 2007). Além disso, o uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos tem causado diversos problemas no ambiente, como por exemplo: contaminação de água, solos e animais; intoxicação de agricultores; eliminação de microrganismos benéficos e o surgimento de resistência em fitopatógenos, insetos e plantas daninhas (SCHWAN-ESTRADA, 2009).

Neste sentido, as plantas medicinais podem ser exploradas na obtenção de pesticidas naturais, pelo uso de seus extratos brutos e/ou óleos essenciais (MORAIS, 2009). O potencial do uso de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, é relatado tanto por sua ação fungitóxica direta (inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos), quanto pela indução de componentes de defesa vegetal, evidenciando seu caráter muitas vezes elicitor (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Smith (1996) define elicitores como moléculas de

qualquer origem, quer sejam bióticas ou abióticas, capazes de estimular respostas de defesa nas plantas.

A erva-luísa (*Aloysia citriodora* Palau), é um arbusto grande da família Verbenaceae, muito ramificado, ereto, com aroma de citral, de 2 a 3 metros de altura, nativo da América do Sul, provavelmente Chile. Esta planta é cultivada em jardins e hortas domésticas no sul do Brasil, principalmente para fins medicinais e ocasionalmente como condimentar na culinária, para temperar saladas e recheios (LORENZI, 2008).

Esta planta possui em seu óleo essencial, diversos componentes, como o citral (ALI et al., 2011), geranial, neral e o limoneno (ARGYROPOULOU et al., 2007). Diversos trabalhos *in vitro* relatam o seu potencial antibacteriano (SARTORATTO et al., 2004; OHNO et al., 2003; DUARTE et al., 2007; ALI et al., 2011), antimicrobiano (ESCOBAR et al., 2010) e antifúngico (DUARTE et al., 2005; ALI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2004; COMBRINCK et al., 2011; LOZADA et al., 2012).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do uso de óleo essencial de *A. citriodora*, no controle *in vitro* de *Fusarium* sp., bem como na indução de resistência em plântulas de beterraba a esta doença, pelo tratamento das sementes com este produto.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial utilizado no trabalho, foi extraído de plantas de *A. citriodora* cultivadas na Horta do Campus Dois Vizinhos da UTFPR. Uma excisada da espécie foi coletada e depositada no Herbário Botânico do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, onde foi realizada a identificação taxonômica pelo curador do herbário, sendo que o código do depósito foi registrado sob o número DVPR 842.

As plantas foram colhidas em estágio vegetativo, quando estavam com 30 a 50 cm de altura, no início da manhã, no mês de maio de 2014, seguindo a metodologia descrita por Paulus et al. (2013) para a espécie. Logo após o corte, as folhas das plantas foram separadas e seccionadas em porções menores. Após, foram colocadas em aparelho de hidrodestilação, modelo Clevenger do Laboratório da Horta, para extração do óleo essencial.

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitossanidade da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos. O isolado utilizado no trabalho foi obtido a partir de plântulas de beterraba infectadas com *Fusarium* sp. O patógeno foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar), incubado em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, sendo repicado até a obtenção de colônias puras do fungo.

Neste primeiro experimento, avaliou-se o crescimento radial do patógeno em placas de Petri. Os tratamentos consistiram de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250% e 0,500%) mais a testemunha (água destilada), em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo considerada como repetição, cada placa de Petri utilizada.

O meio de cultura BDA utilizado no experimento foi esterilizado em autoclave, a temperatura de 120°C , por vinte minutos. O óleo essencial foi incorporado, após o resfriamento (temperatura em torno de 40°C) do meio de cultura, sendo em seguida, vertido em placas de Petri de 8 cm de diâmetro. Após, as placas foram esterilizadas abertas em câmara de fluxo laminar, com luz ultravioleta germicida por dez minutos.

O patógeno foi manipulado em câmara de fluxo laminar, sendo colocado no centro de cada placa, na forma de disco de micélio puro, com o diâmetro de 7 mm. Após as placas foram tampadas e vedadas com papel filme plástico. Com caneta de retroprojeto, foram marcados nas tampas, os diâmetros A e B, de forma perpendicular, nos quais foram realizadas as medições para avaliação do crescimento radial dos fungos.

Em câmara de crescimento as placas foram acondicionadas, sendo então, submetidas à temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de doze horas. O experimento encerrou-se quando a primeira placa foi atingida nas bordas pelo crescimento radial do fungo, tendo isto ocorrido em quatro dias (96 horas).

No segundo experimento *in vitro*, seguiu-se a mesma metodologia de incorporação do óleo essencial ao meio de cultivo, utilizada no primeiro experimento. Neste trabalho, avaliou-se a germinação de conídios de *Fusarium* sp., em função de concentrações (0,0155%; 0,0315%; 0,0625%; 0,125%; 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora*, diluído em meio BD (batata dextrose) mais a testemunha (meio BD com 0% de óleo essencial). Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso com cinco repetições para cada tratamento. As unidades experimentais consistiram de uma lâmina para microscopia com 1 mL do tratamento.

O inóculo de *Fusarium* sp. foi proveniente de placa de Petri com meio BDA, cultivado por dez dias. Para obtenção da suspensão de conídios, foi adicionado 20 mL de água destilada e esterilizada na placa. Com auxílio de escova de cerdas macias, procedeu-se a raspagem das colônias.

As suspensões provenientes da raspagem foram filtradas em camada dupla de gases esterilizadas. Para serem adicionadas ao meio de cultura, procedeu-se a calibração da suspensão de esporângios em Câmara de Neubauer (hemacitômetro), para $2,2 \times 10^6$ conídios mL^{-1} . As lâminas foram primeiramente esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 minutos e após, receberam 1 mL dos tratamentos com a suspensão do inóculo de esporângios de *Pythium* sp. Após, as lâminas com seus respectivos tratamentos e o inóculo do patógeno, foram acondicionadas em caixas plásticas transparentes esterilizadas, forradas com papel filtro esterilizado e umedecido com água deionizada. Desta forma, as caixas plásticas foram acondicionadas em câmara de crescimento a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por 24 horas.

A avaliação deste experimento foi realizada mediante a contagem da germinação dos primeiros vinte conídios visualizados de *Fusarium* sp., em microscópio óptico, do canto esquerdo superior, em direção ao canto direito superior da lâmina. Consideraram-se germinados, os conídios que assim possuíam iniciação do tubo germinativo, visível ao avaliador.

TESTE DE FITOTOXIDEZ DO ÓLEO ESSENCIAL NAS SEMENTES

O terceiro experimento, realizado no Laboratório de Análise de Sementes da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, objetivou a avaliação do efeito do óleo essencial na germinação de sementes de beterraba. Os tratamentos avaliados consistiram de concentrações (0,0625%, 0,125% e 0,250%) de óleo essencial de *A. citriodora* em água destilada, mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%).

As sementes de beterraba utilizadas no experimento, foram procedentes da empresa produtora ISLA Sementes. Utilizou-se a cv. Maravilha, produzida na safra 2014. O poder germinativo das sementes era de 98% e a pureza 99,9%. As sementes passaram por beneficiamento pós-colheita da empresa produtora, mas não receberam tratamento químico.

As sementes foram desinfestadas por cinco minutos, com imersão em solução de água destilada com hipoclorito de sódio a 5%. Após a desinfestação, as sementes foram

lavadas em água destilada e imersas novamente por mais uma hora, em água destilada e deionizada para quebra de dormência e obtenção de germinação mais uniforme.

Decorrido o tempo para a quebra de dormência, as sementes de beterraba foram retiradas da imersão e colocadas em papel absorvente para secagem. Os tratamentos foram aplicados nas sementes após secas, em embalagens plásticas transparentes, até obtenção de mistura uniforme. Utilizou-se 10 mL de cada tratamento, para tratar cada repetição de 100 sementes.

A porcentagem de germinação foi avaliada, de acordo com as Regras para Análises de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), com cinco repetições de cem sementes para cada tratamento, em delineamento inteiramente ao acaso. Foram realizadas contagens aos quatro e aos quatorze dias após a implantação dos testes. O substrato utilizado foi de rolo de papel para germinação de sementes (RP), umedecidos 2,5 vezes sua massa com água destilada. Após a montagem, o teste de germinação foi conduzido em câmara germinadora modelo Mangelsdorf, na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$. A reposição de água foi realizada mediante constatação visual de reumedecimento do substrato. Os resultados foram expressos em porcentagem.

O comprimento de plântulas e massa fresca de plântulas foi realizado de acordo com metodologia proposta por Nakagawa (1994), com cinco repetições de 20 sementes, colocadas para germinar em RP no interior de câmara germinadora modelo Mangelsdorf. Aos quatorze dias, com papel milimetrado, procedeu-se a medição da parte aérea e de raízes das plântulas germinadas, sendo o resultado expresso em milímetros por plântula. A determinação da massa de matéria fresca de plântulas foi conduzida conjuntamente com o teste de comprimento de plântulas. Após a medição das plântulas, realizou a pesagem individual das mesmas e o resultado foi expresso em gramas por plântula.

TESTE EM SUBSTRATO INOCULADO COM O PATÓGENO

O quarto trabalho, realizado na Câmara de Crescimento do Laboratório de Fitossanidade do Campus Dois Vizinhos da UTFPR, objetivou avaliar o efeito do óleo essencial no tratamento de sementes, no desenvolvimento das plântulas e na proteção contra o tombamento de plântulas, em substrato inoculado com *Fusarium* sp. Os tratamentos utilizados foram concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,0625%; 0,125% e 0,250%) em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80® (0,5%) e a testemunha em água destilada mais

espalhante adesivo Tween 80® (0,5%), em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições.

As unidades experimentais constituíram-se de bandejas de isopor, com dimensão de 70 X 40 X 6 cm. Estas possuíam cem células cada, com dimensão de 35 X 35 mm na parte superior e 10 X 10 mm na cavidade inferior e altura de 60 mm. Cada célula recebeu substrato inoculado com micélio de *Fusarium* sp. e uma semente de beterraba.

As sementes utilizadas foram da mesma procedência do experimento em RP anterior. Bem como os procedimentos para desinfecção das sementes, quebra de dormência e para o seu tratamento com o óleo essencial, seguiram os mesmos procedimentos do experimento em RP.

Utilizou-se como substrato nas células das bandejas, composto para horticultura da marca Tecnomax®, contendo como componentes principais: casca de pínus, casca de arroz carbonizada, carvão vegetal e vermiculita, compostadas e carbonizadas. O substrato recebeu desinfecção prévia antes de receber o inóculo do patógeno, por meio de esterilização em autoclave por quarenta minutos a 120°C.

O inóculo de *Fusarium* sp., foi produzido em grãos de trigo autoclavados, em embalagens plásticas, contendo meio quilo do grão. As embalagens com o trigo e o patógeno, foram acondicionadas em câmara de crescimento a 24°C±1°C e fotoperíodo de 12 horas por 60 dias, quando o fungo havia colonizado por completo o substrato.

Desta forma, os grãos de trigo miceliados, como fonte de inóculo do patógeno, foram misturados ao substrato autoclavado, na quantidade de 20g. Kg⁻¹. O substrato, assim inoculado com o patógeno foi acondicionado nas bandejas de isopor, sendo deixado por dez dias antes da semeadura da beterraba. Neste período foram realizadas também, irrigações diárias, com a finalidade de adaptar o patógeno ao máximo às condições do experimento.

Logo após terem sido tratadas as sementes com o óleo essencial, procedeu-se a semeadura das mesmas nas bandejas com os substratos infestados. As células então foram umedecidas e colocadas na Câmara de Crescimento, à temperatura de 25°C±2°C e 65%±10% de umidade relativa, por quatorze dias. Sempre que necessário, as bandejas foram umedecidas para evitar a dessecação do substrato.

Duas avaliações foram realizadas, seguindo a metodologia descrita na Regra de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), sendo a primeira aos quatro dias e a segunda, aos quatorze dias após a implantação dos testes. As quatro dias, realizou-se a contagem de sementes emergidas, sendo os resultados expressos em porcentagem de emergência.

Na segunda avaliação, realizou-se a contagem de sementes emergidas e de plântulas com tombamento de pós-emergência. Após, as plântulas foram retiradas com cuidado das células, evitando a sua quebra, lavadas em água corrente e dispostas sobre papel absorvente para secagem. Em seguida, procedeu-se a mensuração do comprimento das plântulas em papel milimetrado e a pesagem em balança analítica para obter a massa fresca. Os resultados da avaliação realizada aos quatorze dias foram expressos em porcentagem de emergência, porcentagem de tombamentos de plântulas em pós-emergência, comprimento médio de plântulas e massa fresca média por plântula.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS TECIDOS VEGETAIS

O material vegetal, incluindo folhas e raízes, oriundos das plântulas de beterraba do quarto experimento, foram utilizados para avaliações bioquímicas. As folhas e raízes foram então lavadas, picadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -20°C . As avaliações bioquímicas realizadas foram as seguintes: teor de proteínas totais; atividade enzimática de peroxidases; fenilalanina amônia-liase (FAL); β -1,3-glucanases e quitinases.

Para a avaliação do teor de proteínas totais, foi utilizando o método descrito por Bradford (1976), onde as amostras foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Após a maceração, o material foi centrifugado (14.000 RPM por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante obtido do processo foi coletado. Dessa forma, o sobrenadante foi levado para leitura em espectrofotômetro a 630 nm, tendo como padrão soro albumina bovina.

As peroxidases foram avaliadas de acordo com método descrito por Matsuno e Uritani (1972). As amostras de tecido vegetal, com peso médio de 0,260 g, foram maceradas em almofariz gelada, e após, adicionou-se 5 mL de solução extratora – tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Em seguida, colocou-se 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma); e o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 4.000 RPM, em temperatura de 4°C . O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático.

O sobrenadante (extrato enzimático), na quantidade de 3,0 mL, foi colocado em um tubo de ensaio, onde em seguida foram adicionados 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0) e 0,5 mL de água oxigenada a 3%, 0,5 mL de guaiacol 0,5%. Esta mistura foi levada para incubação em banho-maria, por 15 minutos, a 30°C .

Depois da incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo onde permaneceram por 5 minutos. No passo seguinte, foi adicionado 0,5 mL de bissulfito de sódio. As leituras foram realizadas após 10 minutos de repouso, em espectrofotômetro, em comprimento de ondas de 450 nm.

Na avaliação da enzima FAL, as amostras foram transferidas e maceradas em almofariz previamente gelado, onde se acresceu 6,0 mL do tampão de extração a 4°C, preparado com mistura de 22,2 g de Tris (Tri hidroximetil-aminometano); 0,37 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP (polivinilpirrolidiona), completando-se o volume para 1000 mL com água destilada e ajustando-se o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N.

As amostras foram maceradas na solução tampão e em seguida, centrifugadas a 6000 RPM por 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi diluído pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração. A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Pipetou-se 1,5 mL de cada extrato enzimático em tubos de ensaio, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg. mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”.

Incubou-se a 40°C por uma hora a mistura, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras em espectrofotômetro, modelo NT-805 NOVATÉCNICA, a 290 nm (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).

Na avaliação das atividades das PRPs quitinase e β-1,3-glucanase, macerou-se as amostras em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0). Após, as amostras foram centrifugadas, a 20.000 RPM por 25 min, na temperatura de -4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas.

A atividade de quitinase foi avaliada por meio da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta. A determinação espectrofotométrica das atividades de β-1,3-glucanase nos extratos, utilizou-se como substrato, solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg mL⁻¹, LoeweBiochemicaGmbH), seguindo metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo et al. (1996).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos experimentos, foram então submetidos à análise estatística. Primeiramente verificou-se o atendimento da pressuposição do modelo matemático, por meio de teste de normalidade, com o Teste de Lilliefors. Os dados com distribuição normal foram submetidos assim, à análise de variância e análise de regressão, quando necessário. Os dados que não possuíam distribuição normal, verificou-se a possibilidade de transformação dos dados para nova análise de variância. Na impossibilidade de avaliar com os dados transformados, procedeu-se a comparação entre os tratamentos, pelo desvio padrão da média.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial de *Fusarium* sp. foi influenciado pelas concentrações de óleo essencial em meio BDA testadas *in vitro*, sendo que até na menor dosagem (0,0155%), esta diferença foi significativa, obtendo-se efeito fungistático. Observou-se também efeito fungicida a partir da concentração de 0,125% de óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 18).

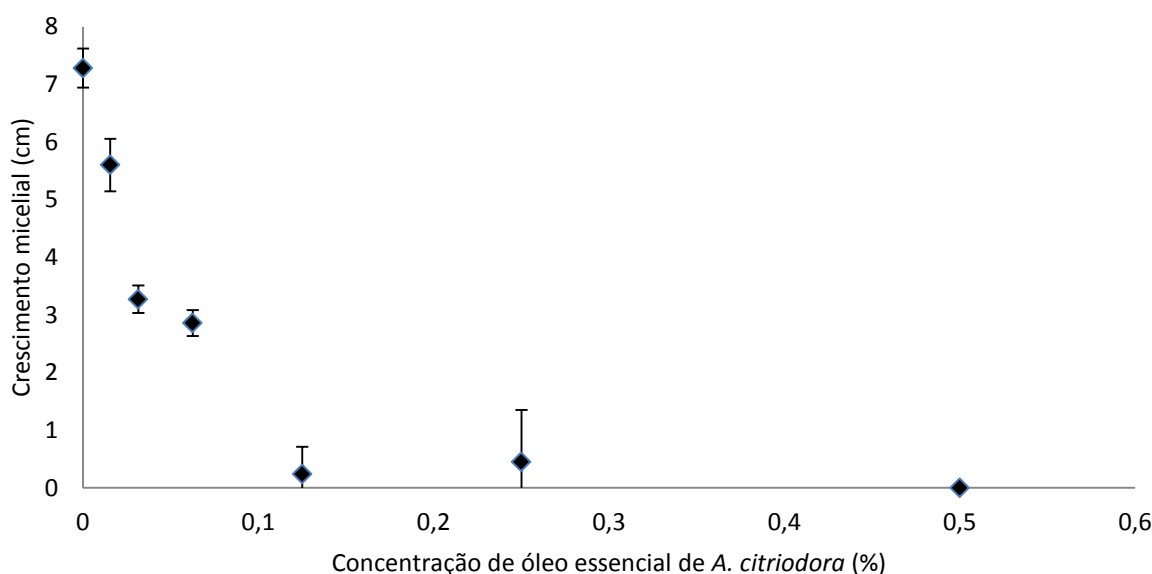


Figura 18: Crescimento micelial de *Fusarium* sp. *in vitro*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri contendo meio BDA, 96 horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.

Resultados obtidos na literatura corroboram com os obtidos no presente trabalho para o gênero *Fusarium*. López et al. (2004) relatam que o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium verticillioides*, foi significativamente reduzido nas faixas de concentração de óleo essencial de *A. citriodora* em meio de cultura entre 0,025% a 0,05%.

Lozada et al. (2012), afirmam que com a utilização de óleo essencial desta espécie e de outras espécies de *Aloysia*, em teste *in vitro*, o crescimento do fungo *Moniliophthora roreri*, causador de monilíose em cacau, foi reduzido a partir da dosagem de 0,2% e ocorreu inibição total do micélio do patógeno nas dosagens de 0,8% a 1%.

Bouchra et al. (2003), relatam que na concentração de 0,025% em meio BDA, o óleo essencial desta planta reduziu o crescimento micelial *in vitro*, nas taxas de 69,4% para *B. cinerea*, 68,2% para *Phytophthora citriophthora*, 44,4% para *Penicillium digitatum* e em 40,4% para *Geotrichum citri-aurantii*.

A concentração mínima necessária de óleo essencial de *A. citriodora* para inibir 100% do crescimento micelial *in vitro*, dos patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* do abacate e da manga, *Alternaria citrii* de laranjas, *Botrytis cinerea* de uvas foi de 0,2%, e para *Penicillium digitatum* de laranjas e *Lasiodiopodia theobramae* de mangas foi de 0,3% (COMBRINCK et al., 2011).

A germinação de conídios de *Fusarium* sp. também foi influenciada pelas concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* testadas, sendo observado nesta variável, um comportamento linear decrescente, com o aumento da concentração em meio de cultura BD (Figura 19). A cada aumento de 0,0625% da concentração do óleo essencial utilizado no tratamento das sementes, houve diminuição de 10,24% na germinação de conídios do patógeno. O controle da germinação dos esporos dos fungos também é importante no controle das doenças de plantas, de acordo com Massola Júnior e Krugner (2011), o esporo é um elemento de dispersão do fungo, capaz de gerar um novo indivíduo.

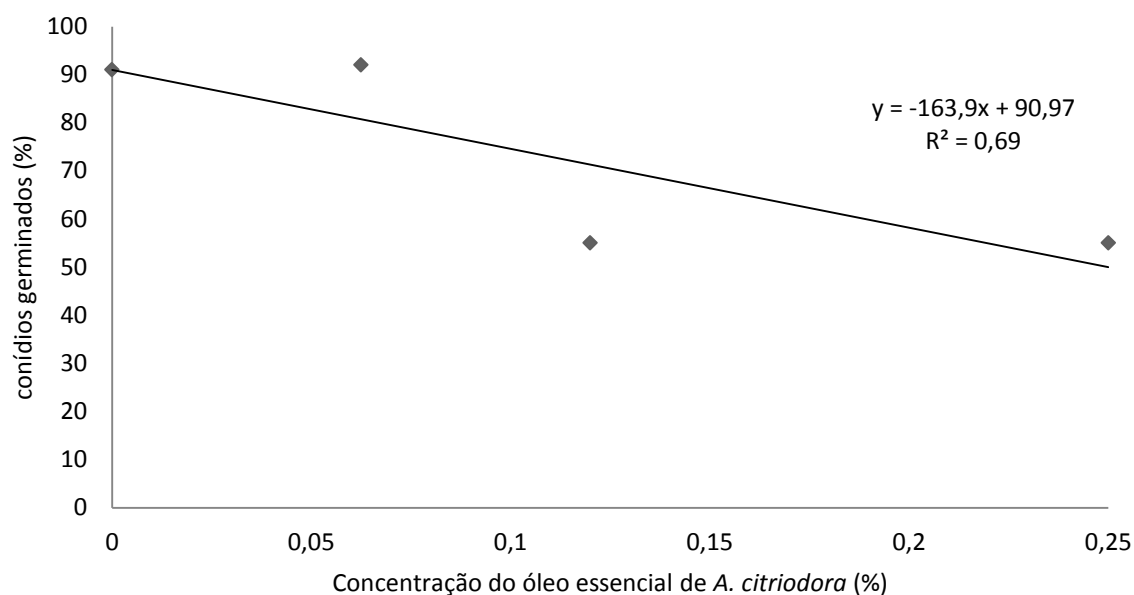


Figura 19: Porcentagem de germinação de conídios de *Fusarium sp.* *in vitro*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em lâminas de microscopia, contendo meio BD, 24 horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.

Dentre os componentes do óleo essencial que podem ter tido efeito no fungo *Fusarium sp.*, estão o citral e o limoneno. De acordo com Paulus et al. (2013), a composição química do óleo essencial de *A. citriodora*, para o mês de maio na região de Dois Vizinhos, PR, sob mesmas condições de coleta e extração, demonstra como principais componentes químicos, o limoneno (14,10%) e o citral (geranial + neral) (49,69%).

Limoneno extraído das plantas das plantas *Mentha spicata* e *Anethum sowa*, também é relatado com efeito antifúngico a vários patógenos humanos (AGGARWAL et al., 2002). Enquanto que o citral extraído de *Lippia alba* é relatado como antifúngico a *Aspergillus fumigatus* e *Candida krusei* (MESA-ARANGO et al., 2009). Extraído de citronela (*Cymbopogon citratus*), é relatado com potencial de controle a várias espécies de fungos, como *Candida albicans*, *Alternaria citrii*, *A. fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Helminthosporium compactum*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichophyton mentagrophytes* (PATRNAIK et al., 1997) e *Rhizoctonia solani* (GONÇALVES, 2012).

O tratamento das sementes de beterraba com óleo essencial de *A. citriodora* não apresentou efeito fitotóxico significativo em teste de germinação em RP, na porcentagem de germinação de sementes aos quatorze dias (Figura 20) e oito dias, e na massa verde de plântulas de beterraba (Tabela 6).

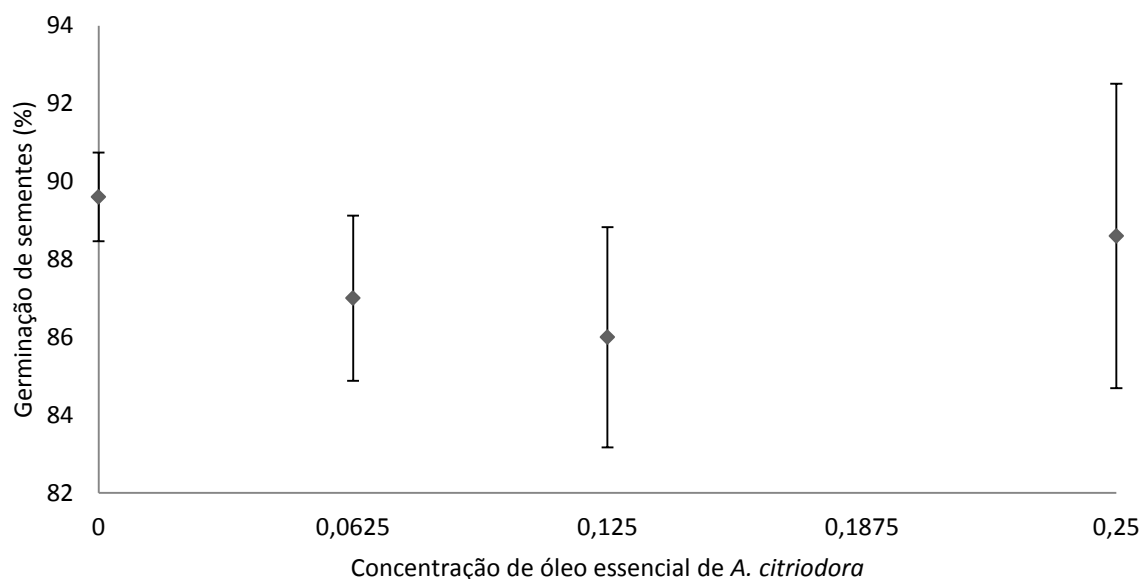


Figura 20: Porcentagem de germinação de sementes de beterraba cv. Maravilha em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de 65%±10%, no escuro, Pato Branco, PR, 2015.

Tabela 6: Porcentagem de germinação de sementes aos quatro dias e massa verde média por plântula de beterraba cv. Maravilha, em teste de germinação em RP, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 70%±10%, no escuro, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Germinação – 4º dia (%)	Massa verde média por plântula (g)
0,0000	72,8 ns	0,039 ns
0,0625	75,4	0,038
0,1250	78,0	0,041
0,2500	76,8	0,038

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na variável comprimento de plântulas em teste de germinação em RP, o tratamento das sementes foi significativo, obtendo-se favorecimento da variável de forma linear crescente com o aumento da concentração testada (Figura 21). Para cada 0,0625% de

óleo essencial aumentado na concentração do tratamento das sementes, houve aumento linear correspondente de 0,37 cm no comprimento das plântulas de beterraba.

Plântulas com crescimento inicial rápido adquirem mais rapidamente resistência contra patógenos causadores de tombamentos. Bedendo (2011) relata que a promoção do rápido desenvolvimento das plântulas é uma das medidas que podem ser utilizadas, para o controle deste tipo de doenças.

No teste em substrato contaminado com inóculo de *Fusarium* sp., a porcentagem de emergência aos quatro e quatorze dias, não foi influenciada significativamente pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 22). Além da porcentagem de emergência, as variáveis comprimento de plântulas, massa verde de plântulas (Tabela 7) e os tombamentos de pós-emergência (Figura 23), não foram influenciadas pelo tratamento das sementes.

Por mais que não houve efeito significativo na redução dos tombamentos de plântulas e nem aumento nas variáveis emergência, massa verde e comprimento de plântulas de beterraba, os resultados bioquímicos mostraram-se promissores, pois houve aumento significativo da atividade enzimática de peroxidases, nos tecidos vegetais nos quais as sementes foram tratadas com 0,25% de óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 24).

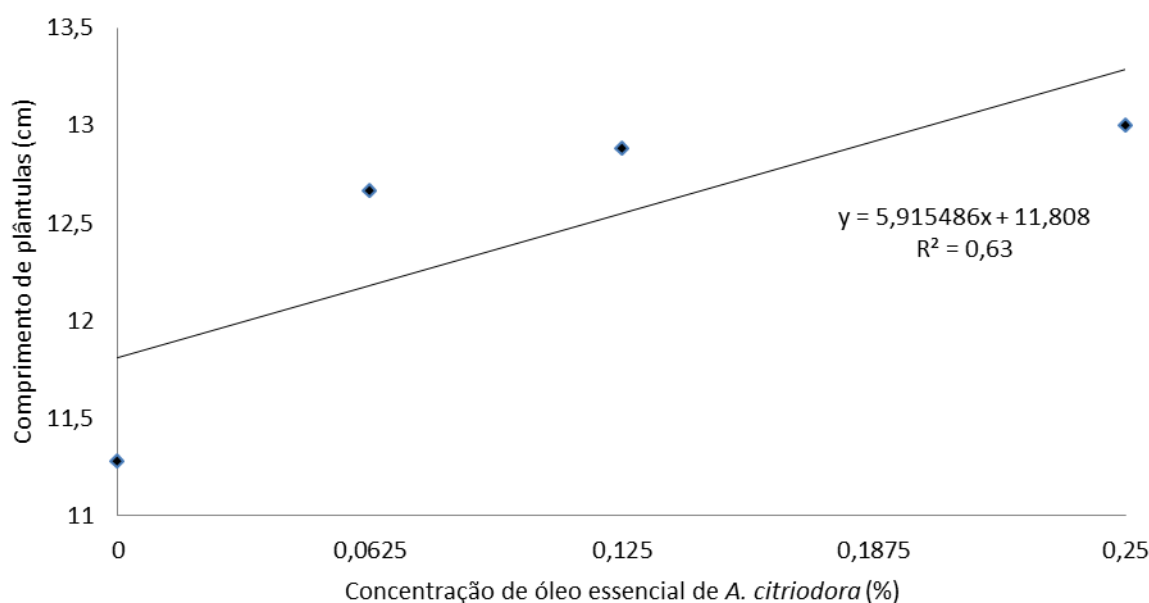


Figura 21: Comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, quatorze dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de 65%±10%, no escuro, UTFPR, Pato Branco, 2015.

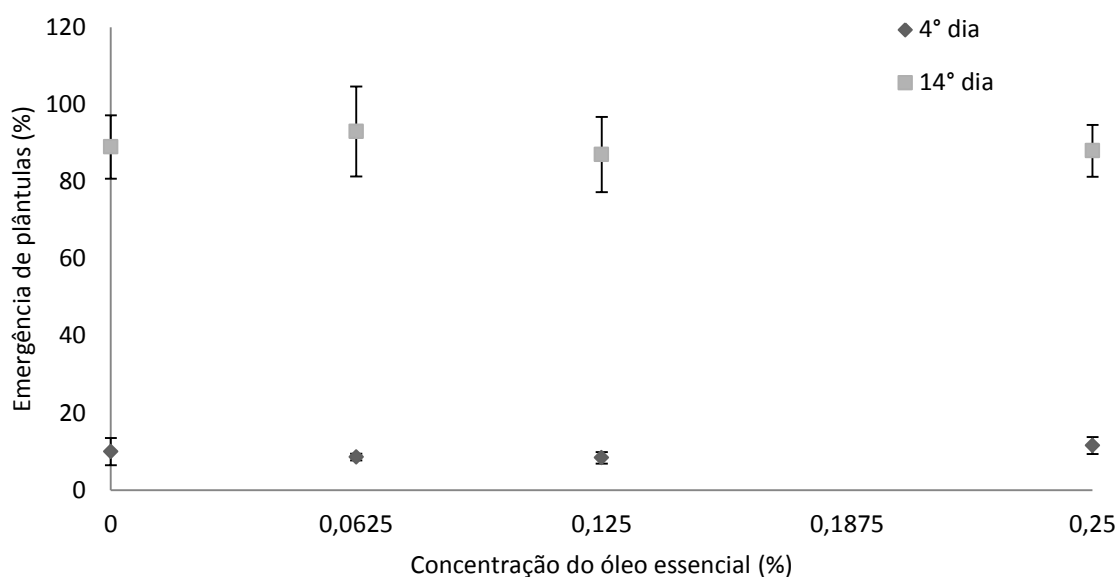


Figura 22: Porcentagem de emergência de plântulas de beterraba cv. Maravilha aos quatro e quatorze dias, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ por quatorze dias, fotoperíodo de 12 horas, Pato Branco, PR, 2015.

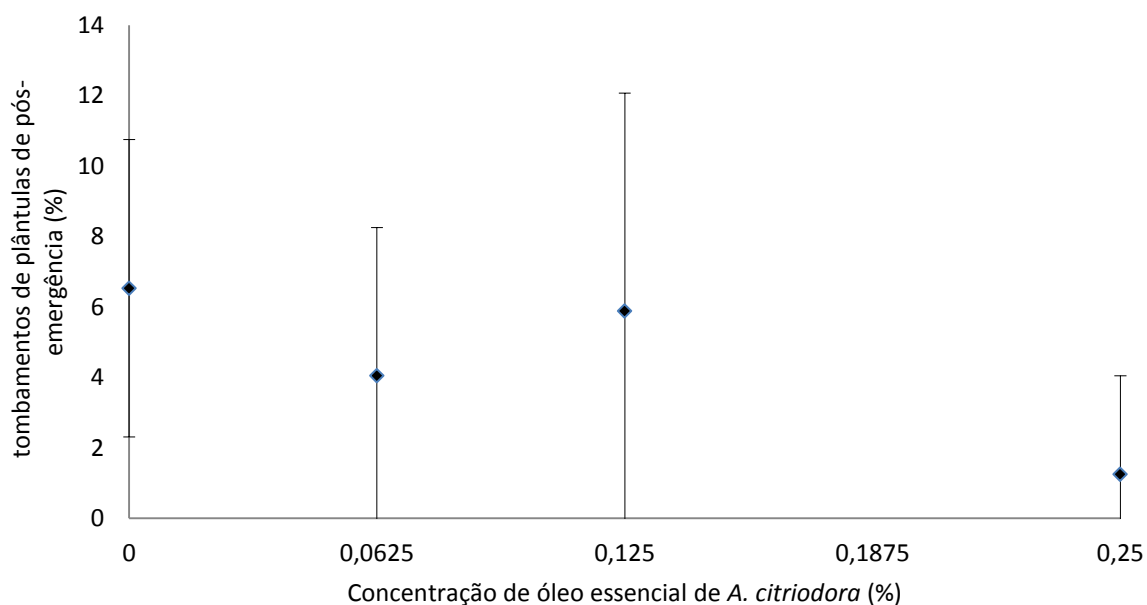


Figura 23: Porcentagem de tombamentos de pós-emergência de plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

Tabela 7: Comprimento médio e massa verde média por plântula de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Massa verde média por plântula (g)	Comprimento médio por plântula (cm)
0,0000	0,065 ns	9,90 ns
0,0625	0,057	10,02
0,1250	0,061	9,72
0,2500	0,066	10,06

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

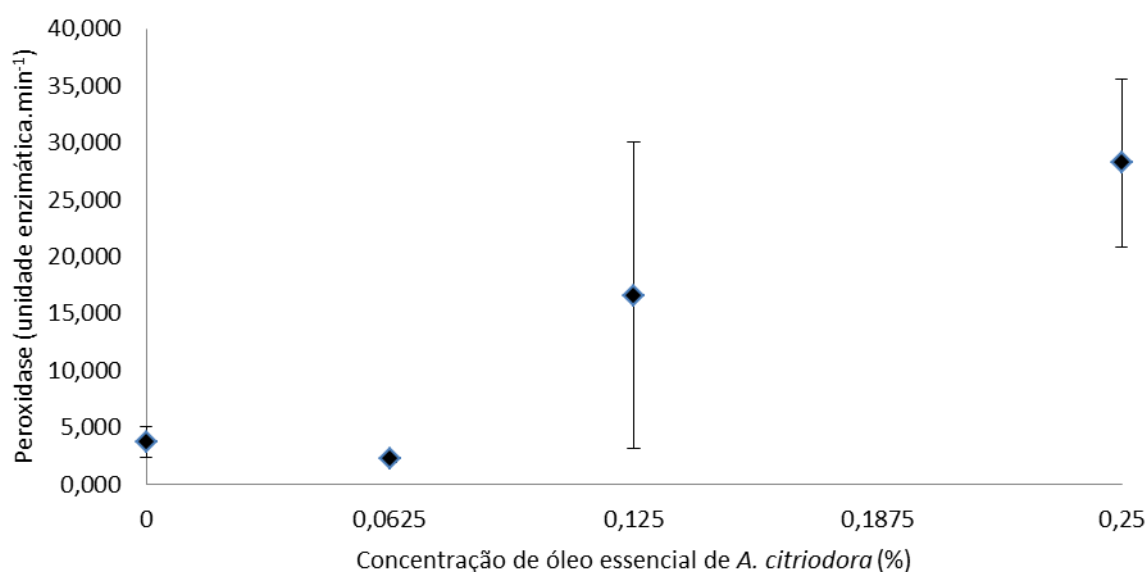


Figura 24: Atividade enzimática de peroxidases de plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

O aumento da atividade enzimática de peroxidases em beterraba é relatada na literatura por Felipini (2011), onde o autor obteve resultados significativos na cultura, pela aplicação foliar dos indutores acibenzolar-S-metil e quitosana. Bargabus et al. (2002) também

constatou significativo efeito na atividade desta enzima, pela aplicação foliar de acibenzolar-S-metil e do indutor biológico *Bacillus mycooides*. Assim como Bargabus et al. (2004), os quais por sua vez constataram efeito significativo nesta variável analisada, pela aplicação foliar do indutor biológico *Bacillus pumilus*.

Uma das respostas mais rápidas de defesa vegetal após o reconhecimento do patógeno, é a formação de espécies ativas de oxigênio, que atuam reforçando a parede celular, pela ligação cruzada de proteínas estruturais ou de componentes fenólicos, formando uma barreira mecânica efetiva e também de forma direta como agente antimicrobiano (RESENDE et al., 2003). Além de participar ativamente no controle de fitopatógenos, as peroxidases, de acordo com Pinto et al. (2011), podem atuar em vias de sinalização de rotas de defesa vegetal.

Entretanto, nas demais análises bioquímicas, não houve efeito significativo do tratamento das sementes de beterraba com óleo essencial de *A. citriodora*, ou seja, não houve aumento do teor protéico, atividade enzimática de β -1,3-glucanases (Tabela 8), de FAL (Figura 25) e de quitinases (Figura 26).

Tabela 8: Teor de proteínas e atividade enzimática de β -1,3-glucanases em plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

Concentração (%)	Teor de proteínas (mg.g^{-1} de tecido)	Atividade enzimática de glucanases (unidade enzimática. mg^{-1} de proteína)
0,0000	2,143 ns	0,167 ns
0,0625	2,238	0,144
0,1250	2,732	0,088
0,2500	2,189	0,142

ns – não significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro.

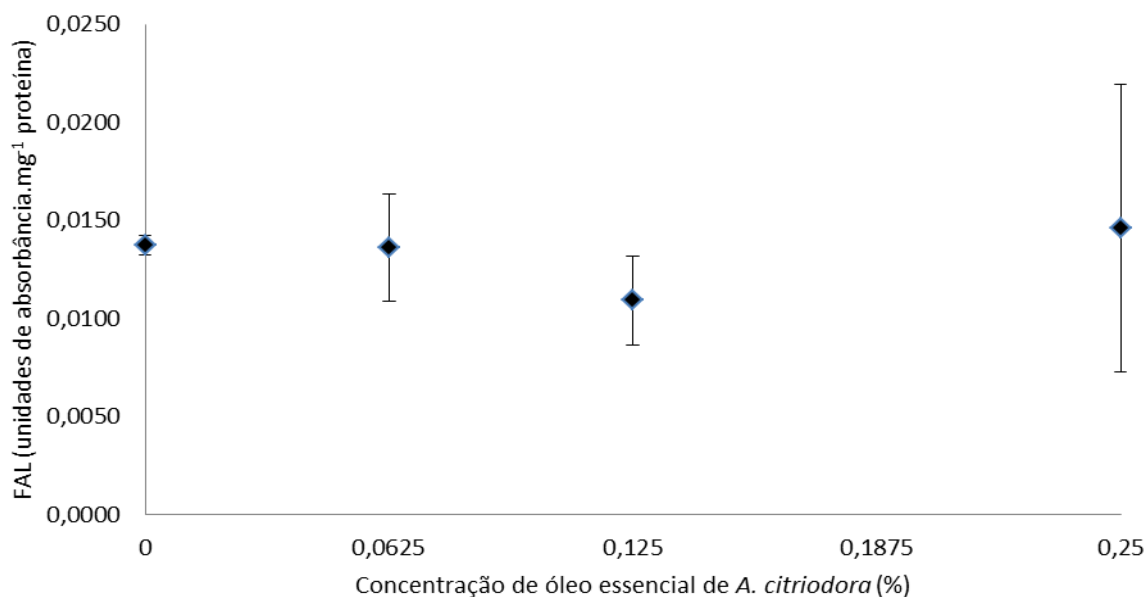


Figura 25: Atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) de plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

Em beterraba, a indução de resistência pelo tratamento das sementes, aumentando a atividade enzimática da FAL, foi observado por Mazaro et al. (2009), onde os autores utilizaram quitosana como agente indutor. Uma das hipóteses de não ter existido diferença significativa na atividade enzimática de FAL, quitinases e β -1,3-glucanases, é a de que no período avaliado esta já havia voltado a concentrações normais, do mesmo padrão do tratamento testemunha, pois a avaliação foi realizada quatorze dias após o tratamento das sementes.

Sugere-se novas pesquisas evidenciando qual deve ser o período ideal para avaliar estas atividades bioquímicas, ou seja, quando é o pico máximo da atividade destas enzimas, quando as sementes de beterraba são tratadas com indutores de resistência.

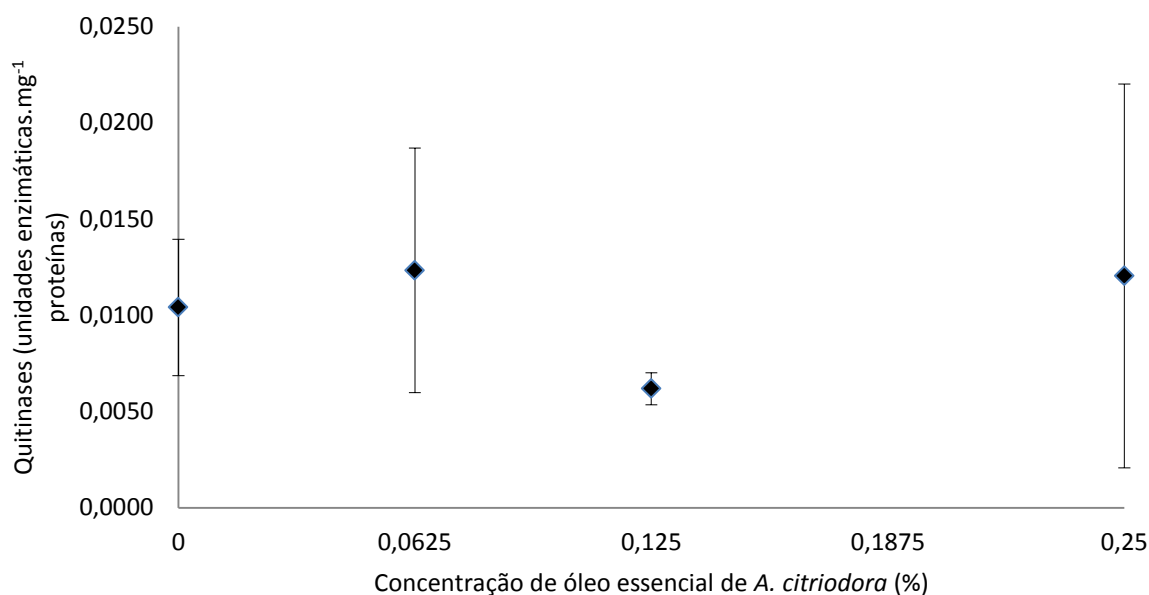


Figura 26: Atividade enzimática de quitinases de plântulas de beterraba cv. Maravilha, em substrato inoculado com *Fusarium* sp., com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por quatorze dias, Pato Branco, PR, 2015.

5.6 CONCLUSÕES

O uso de óleo essencial de *A. citriodora* no tratamento de sementes de beterraba cv. Maravilha, não teve efeito significativo na diminuição dos tombamentos de pós-emergência, no entanto, os resultados obtidos são promissores, pois na concentração de 0,25%, houve aumento da atividade enzimática de peroxidases.

Promissores também são os resultados obtidos *in vitro*, pois o óleo mostrou efeito fungistático e fungicida no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Fusarium* sp. Os componentes presentes no óleo com mais provável efeito fungistático e fungicida, são o limoneno e o citral.

Outro fator positivo a aplicação do óleo nas sementes, foi o fato de não haver sintomas de fitotoxidez no teste de germinação em RP, pois o seu uso inclusive aumentou o comprimento das plântulas.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARVAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; SANTHA KUMAR, T.R.; GUPTA, V.K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, n.1, p. 59-63, 2002.

ALI, H.F.M.; EL-BELTAGI, H.S.; NASR, N.F. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3044-3053, 2011.

ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; FASSEAS, C.; POLISSIOU, M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, n.5, p. 289-298, 2002.

BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. **Biological Control**, v.30, n.2, p. 342-350, 2004.

BEDENDO, I.P. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 22. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BOUCHRA, C.; MOHAMED, A.; MINA, I.H.; HMAMOUCI, M. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p. 251-256, 2003.

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

BRASIL, **Regras para análises de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009, 399p.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FELIPINI, R.B. Avaliação de indutores de resistência para o controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis* Cke.) e da cercosporiose da beterraba (*Cercospora beticola* Sacc.). **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, UFSC, Florianópolis, 2011, 110p.

GONÇALVES, A.H. Atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. no controle de fitopatógenos do feijoeiro comum. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFT, Gurupi, 2012, 90p.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454, 1996.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F., Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. Rockville, v.62, p.31-35, 1978.

LÓPEZ, A.G.; THEUMER, M.G.; ZYGADLO, J.A.; RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B₁ production in corn grain. **Mycopathologia**, v. 158, p. 343-349, 2004.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2 ed., 2008, 544p.

LOZADA, B.S.; HERRERA, L.V.; PEREA, J.A.; STASHENKO, E.; ESCOBAR, P. In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans et al., causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Acta Agronomica**, v. 61, n. 2, p. 94-102, 2012.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 149-206, 2011.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAZARO, S.M.; WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J.C.; GOUVÊA, A. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p. 1424-1430, 2009.

MESA-ARANGO, A.C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.6, p. 878-884, 2009.

MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap. 9, p. 139-152, 2009.

NEVES, M.C.P.; NEVES, J.F. **Agricultura Orgânica e Produção Integrada: diferenças e semelhanças. Documentos 237**, Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 20p., 2007.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KAHSIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; BAPAJI, M.; KOLE, C.R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, p. 39-46, 1997.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G.A.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v.60, n.3, p. 372-379, 2013.

PINTO, M.S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.2, p. 241-248, 2011.

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

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fuzarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores: abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p. 4038-4045, 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45, 1996.

TIVELLI, S.W.; FACTOR, T.L.; TERAMOTO, J.R.S.; FABRI, E.G.; MORAES, A.R.A.; TRANI, P.E.; MAY, A. **Beterraba: do plantio à comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2011, 45p.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os óleos essenciais obtidos a partir de plantas aromáticas e medicinais são uma fonte inesgotável de moléculas com os mais diversos potenciais, dentre eles a utilização na agricultura para controle de pragas e doenças.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram promissores, pois o seu uso no tratamento das sementes, reduziu os tombamentos de pós-emergência em plântulas de pepino e de feijão, o que pode estar relacionado ao seu efeito fungistático e fungicida direto ou ao seu efeito como indutor de mecanismos de resistência.

O óleo de *A. citriodora* demonstrou ter efeito fungistático e fungicida aos patógenos testados, ou seja, a *Pythium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e a *Fusarium* sp., muito provavelmente pela ação dos seus componentes majoritários, que são o citral e o limoneno.

Os mecanismos de resistência evidenciados nos trabalhos, estão relacionados ao aumento da atividade enzimática de peroxidases nas três culturas estudadas, feijoeiro, pepino e beterraba. Além desta enzima, houve aumento na atividade da PRP β -1,3-glucanase em feijoeiro e em pepino.

Entretanto, alguns cuidados com relação à fitotoxidez do óleo precisam ser observados. No teste de germinação em RP, houve diminuição da germinação de feijoeiro na concentração de 0,25% e houve diminuição do comprimento de plântulas de pepino em concentrações acima de 0,207% de óleo essencial.

Entretanto, são necessários maiores estudos com o óleo essencial desta planta, isolando seus componentes majoritários e testando-os individualmente, buscando assim melhores resultados e também formas corretas de aplica-los.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO 01:** Análise de variância da porcentagem de esporângios de *Pythium* sp. germinados em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, nove horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro.....113
- ANEXO 02:** Análise de variância do comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....113
- ANEXO 03:** Análise de variância da massa verde por plântula de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....114
- ANEXO 04:** Análise de variância da porcentagem de emergência de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....114
- ANEXO 05:** Análise de variância do comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....115
- ANEXO 06:** Análise de variância da massa verde por plântula de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....115
- ANEXO 07:** Análise de variância do teor de proteínas totais em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....116
- ANEXO 08:** Análise de variância da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....116
- ANEXO 09:** Análise de variância da atividade enzimática de quitinase em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de

óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....117

ANEXO 10: Análise de variância da atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....117

ANEXO 11: Análise de variância da atividade de glucanases em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....118

ANEXO 12: Análise de variância do Índice de Velocidade de Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* aos oito dias após incubação *in vitro* em placas de Petri com meio de cultura BDA, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro.....118

ANEXO 13: Análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ no escuro.....119

ANEXO 14: Análise de variância da massa verde por plântula de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....119

ANEXO 15: Análise de variância do comprimento médio de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....120

ANEXO 16: Análise de variância da porcentagem de emergência de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....120

ANEXO 17: Análise de variância da massa verde média por plântula de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....121

ANEXO 18: Análise de variância do comprimento médio de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....121

ANEXO 19: Análise de variância da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase do tecido de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....122

ANEXO 20: Análise de variância da porcentagem de conídios de *Fusarium* sp. germinados em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, 24 horas após incubação em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....122

ANEXO 21: Análise de variância do comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.....123

ANEXO 22: Análise de variância do comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....123

ANEXO 23: Análise de variância da massa verde de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias, postas para germinar incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.....124

ANEXO 01: Análise de variância da porcentagem de esporângios de *Pythium* sp. germinados em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, nove horas após incubação em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	8028,16	8028,16	39,2575**
Reg. Quadrática	1	480,20	480,20	2,3482 ns
Reg. Cúbica	1	1697,44	1697,44	8,3004*
Tratamentos	3	10205,80	3401,93	16,6354 --
Resíduo	16	3272,00	204,50	
Total	19	13477,80		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 02: Análise de variância do comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em papel germiteste, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	1,5876	1,5876	0,4898 ns
Reg. Quadrática	1	0,8820	0,8820	0,2721 ns
Reg. Cúbica	1	1,6384	1,6384	0,5055 ns
Tratamentos	3	4,1080	1,3693	0,4225 --
Resíduo	16	51,8600	3,2412	
Total	19	55,9680		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 03: Análise de variância da massa verde por plântula de feijoeiro cv. Uirapuru em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,1267	0,1267	14,8533 **
Reg. Quadrática	1	0,0007	0,0007	0,0844 ns
Reg. Cúbica	1	0,0331	0,0331	3,8821 ns
Tratamentos	3	0,1606	0,0535	6,2733 --
Resíduo	16	0,1365	0,0085	
Total	19	0,2971		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 04: Análise de variância da porcentagem de emergência de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	225,00000	225,00000	5,1429 **
Reg. Quadrática	1	80,00000	80,00000	1,8286 ns
Reg. Cúbica	1	0,00000	0,00000	0,0000 ns
Tratamentos	3	305,00000	101,66667	2,3238 --
Resíduo	16	700,00000	43,75000	
Total	19	1005,00000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 05: Análise de variância do comprimento de plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	3,72490	3,72490	2,0181 ns
Reg. Quadrática	1	1,05800	1,05800	0,5732 ns
Reg. Cúbica	1	1,18810	1,18810	0,6437 ns
Tratamentos	3	5,97100	1,99033	1,0783 --
Resíduo	16	29,53200	1,84575	
Total	19	35,50300		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 06: Análise de variância da massa verde por plântula de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,05476	0,05476	3,2946 ns
Reg. Quadrática	1	0,01568	0,01568	0,9434 ns
Reg. Cúbica	1	0,00384	0,00384	0,2313 ns
Tratamentos	3	0,07428	0,02476	1,4898 --
Resíduo	16	0,26592	0,01662	
Total	19	0,34020		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 07: Análise de variância do teor de proteínas totais em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,31959	0,31959	0,7190 ns
Reg. Quadrática	1	0,20784	0,20784	0,4676 ns
Reg. Cúbica	1	0,00005	0,00005	0,0001 ns
Tratamentos	3	0,52747	0,17582	0,3956 --
Resíduo	16	7,11204	0,44450	
Total	19	7,63951		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 08: Análise de variância da atividade enzimática da enzima fenilalanina amônia-liase em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00004	0,00004	3,3754 ns
Reg. Quadrática	1	0,00001	0,00001	0,8612 ns
Reg. Cúbica	1	0,00001	0,00001	0,5176 ns
Tratamentos	3	0,52747	0,17582	1,5848 --
Resíduo	16	0,00006	0,00002	
Total	19	0,00025		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 09: Análise de variância da atividade enzimática de quitinase em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00001	0,00001	0,1592 ns
Reg. Quadrática	1	0,00000	0,00000	0,0443 ns
Reg. Cúbica	1	0,00003	0,00003	0,8055 ns
Tratamentos	3	0,00004	0,00001	0,3363 --
Resíduo	16	0,00067	0,00004	
Total	19	0,00071		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 10: Análise de variância da atividade de peroxidases em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	81,49242	81,49242	1,8819 ns
Reg. Quadrática	1	0,02055	0,02055	0,0005 *
Reg. Cúbica	1	22,28043	22,28043	0,5145 ns
Tratamentos	3	103,79340	34,59780	0,7990 --
Resíduo	16	692,84809	43,30301	
Total	19	796,64149		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 11: Análise de variância da atividade de glucanases em plântulas de feijoeiro cv. Uirapuru em substrato inoculado com *Pythium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos nove dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00068	0,00068	1,7290 ns
Reg. Quadrática	1	0,00400	0,00400	10,1373 **
Reg. Cúbica	1	0,00066	0,00066	1,6613 ns
Tratamentos	3	0,00534	0,00178	4,5092 --
Resíduo	16	0,00632	0,00039	
Total	19	0,01165		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 12: Análise de variância do Índice de Velocidade de Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* aos oito dias após incubação *in vitro* em placas de Petri com meio de cultura BDA, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, em câmara de crescimento a $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	746,93	746,93	1189,85**
Reg. Quadrática	1	43,51	43,51	69,31**
Reg. Cúbica	1	22,94	22,94	36,55**
Tratamentos	3	813,39	271,13	431,91 --
Resíduo	16	10,04	0,63	
Total	19	823,43		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 13: Análise de variância da porcentagem de germinação de sementes de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a 25°C e umidade relativa de 65%±10% no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,0900	0,0900	0,36 ns
Reg. Quadrática	1	0,4500	0,4500	1,80 ns
Reg. Cúbica	1	0,0100	0,0100	0,04 ns
Tratamentos	3	0,5500	0,1833	0,73 --
Resíduo	16	4,0000	0,2500	
Total	19	4,55		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 14: Análise de variância da massa verde por plântula de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 70%±10% no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00122	0,00122	0,6066 ns
Reg. Quadrática	1	0,00051	0,00051	0,2540 ns
Reg. Cúbica	1	0,00011	0,00011	0,0570 ns
Tratamentos	3	0,00184	0,00061	0,3059 --
Resíduo	16	0,03213	0,00201	
Total	19	0,03397		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 15: Análise de variância do comprimento médio de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em teste de germinação em RP, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	3,82203	3,82203	1,5007 ns
Reg. Quadrática	1	17,95513	17,95513	7,0500 *
Reg. Cúbica	1	1,07123	1,07123	0,4206 ns
Tratamentos	3	22,84837	7,61612	2,9905 --
Resíduo	16	40,74900	2,54681	
Total	19	63,59738		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 16: Análise de variância da porcentagem de emergência de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,25000	0,25000	0,0148 ns
Reg. Quadrática	1	11,25000	11,25000	0,6667 ns
Reg. Cúbica	1	42,25000	42,25000	2,5037 ns
Tratamentos	3	53,75000	17,91667	1,0617 --
Resíduo	16	270,00000	16,87500	
Total	19	323,75000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 17: Análise de variância da massa verde média por plântula de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00003	0,00003	0,0249 ns
Reg. Quadrática	1	0,00041	0,00041	0,4040 ns
Reg. Cúbica	1	0,00423	0,00423	4,2145 ns
Tratamentos	3	0,00466	0,00155	1,5478 --
Resíduo	16	0,01604	0,00100	
Total	19	0,02069		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 18: Análise de variância do comprimento médio de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	2,17268	2,17268	2,1224 ns
Reg. Quadrática	1	0,26912	0,26912	0,2629 ns
Reg. Cúbica	1	0,00006	0,00006	0,0001 ns
Tratamentos	3	2,44186	0,81395	0,7951 --
Resíduo	16	16,37912	1,02369	
Total	19	18,82098		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 19: Análise de variância da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase do tecido de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18 em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos oito dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00070	0,00070	5,1572 *
Reg. Quadrática	1	0,00016	0,00016	1,1488 ns
Reg. Cúbica	1	0,00000	0,00000	0,0330 ns
Tratamentos	3	0,00086	0,00029	2,1130 --
Resíduo	16	0,00218	0,00014	
Total	19	0,00305		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 20: Análise de variância da porcentagem de conídios de *Fusarium* sp. germinados em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em microcultivo sobre lâmina para microscopia contendo meio BD, 24 horas após incubação em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	5256,25	5256,25	27,1290**
Reg. Quadrática	1	1,25	1,25	0,0065 ns
Reg. Cúbica	1	1406,25	1406,25	7,2581*
Tratamentos	3	6663,75	2221,25	11,4645 --
Resíduo	16	3100,00	193,75	
Total	19	9763,75		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 21: Análise de variância do comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias após incubação em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$ no escuro.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	7,23610	7,23610	7,3989 *
Reg. Quadrática	1	1,98450	1,98450	2,0291 ns
Reg. Cúbica	1	0,28090	0,28090	0,2872 ns
Tratamentos	3	9,50150	3,16717	3,2384 --
Resíduo	16	15,64800	0,97800	
Total	19	25,14950		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 22: Análise de variância do comprimento de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00706	0,00706	0,0171 ns
Reg. Quadrática	1	0,06272	0,06272	0,1523 ns
Reg. Cúbica	1	0,27878	0,27878	0,6769 ns
Tratamentos	3	0,34856	0,11619	0,2821 --
Resíduo	16	6,58932	0,41183	
Total	19	6,93788		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 23: Análise de variância da massa verde de plântulas de beterraba cv. Maravilha em substrato inoculado com *Fusarium* sp., tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, aos quatorze dias, postas para germinar em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $65\%\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

FV	GL	SQ	QM	F
Reg. Linear	1	0,00001	0,00001	0,1378 ns
Reg. Quadrática	1	0,00019	0,00019	2,5859 ns
Reg. Cúbica	1	0,00003	0,00003	0,4219 ns
Tratamentos	3	0,00023	0,00008	1,0485 --
Resíduo	16	0,00119	0,00007	
Total	19	0,00142		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade. * significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns - não significativo ao nível de 5% de probabilidade.