

ÓLEO ESSENCIAL DE *Aloysia citriodora* NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM PEPINO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Álvaro Rodrigo Freddo^{1*}, Adriano Lewandowski², Cleverson Busso³, Flávio Endrigo Cechim¹, Ivan Carlos Zorzzi², Maristela dos Santos Rey³, Nean Locatelli Dalacosta², Sérgio Miguel Mazaro³

¹ Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Pato Branco, PR. *Autor para correspondência. E-mail: a.r.freddo@bol.com.br.

² Graduando em Engenharia Agrônômica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR.

³ Prof(a). Dr(a)., Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Campus Dois Vizinhos, PR.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial do óleo essencial de erva-lúisa (*Aloysia citriodora*) no tratamento de sementes de pepino, para controle de tombamentos de plântulas causados por *Sclerotinia sclerotiorum* e atividade antifúngica *in vitro*. Foram realizados dois experimentos *in vitro* e um teste *in vivo* com o tratamento das sementes com o óleo essencial. No primeiro experimento, avaliou-se atividade antifúngica *in vitro* de concentrações do óleo essencial em meio BDA, no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, em placas de Petri. No segundo experimento *in vitro*, avaliou-se o efeito do óleo essencial em concentrações em meio de cultura BDA, na germinação miceliogênica de escleródios. No terceiro experimento, testou-se o tratamento das sementes em óleo essencial de *A. citriodora* diluído em água destilada mais espalhante adesivo Tween 80. As sementes foram semeadas em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*. 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 tem potencial fungistático e fungicida *in vitro* sendo a maior redução observada nas maiores doses testadas e também no controle do tombamento de plântulas, onde observou-se melhor resultado na concentração de 0,06%. Além disso, o óleo essencial de *A. citriodora* aplicado às sementes, induziu mecanismos bioquímicos de resistência, evidenciados pelo aumento da atividade bioquímica das peroxidases até a concentração de 0,24% e da FAL e β -1.3-glucanases em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: Controle alternativo. Plantas medicinais. Fitopatologia. Mofo branco. *Cucumis sativus* L.

ESSENTIAL OIL OF *Aloysia citriodora* IN CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* ON CUCUMBER AND ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN VITRO*

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the potential of the essential oil of fennel luísa (*Aloysia citriodora*) in the treatment of cucumber seeds to control damping off caused by

Sclerotinia sclerotiorum and its antifungal activity *in vitro*. There were two *in vitro* experiments and one *in vivo* with seed treatment with the essential oil. In the first experiment it was evaluated the antifungal *in vitro* activity of concentrations of essential oil on PDA, about mycelial growth of *S. sclerotiorum*, in Petri dishes. The second *in vitro* experiment it was evaluated the effect of the essential oil at concentrations in PDA culture medium, in sclerotia miceliogenic germination. In the third experiment it was tested seed treatment with essential oil from *A. citriodora* diluted in distilled water plus Tween 80 adhesive spreader. The seeds were sown in substrate inoculated with *S. sclerotiorum*. 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 lyase (PAL); β -1,3-glucanases and chitinases). The results showed that the oil has fungistatic and fungicidal potential *in vitro* being the largest reduction observed in the highest doses tested and also in the control of *damping off*, where it was observed a better result in the concentration of 0.06%. In addition, the essential oil of *A. citriodora* applied to the seeds induced resistance biochemical mechanisms, evidenced by the increase of the biochemical activity of the peroxidases to the concentration of 0.24% and of the PAL and β -1,3-glucanases in all concentrations tested.

Key words: Alternative control. Medicinal herbs. Phytopatology. White mold. *Cucumis sativus* L.

INTRODUÇÃO

O pepino é muito cultivado em ambiente protegido e uma das principais doenças neste sistema é o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (ETHUR *et al.*, 2005). O patógeno produz estruturas de resistência, denominadas de escleródios, podendo persistir por vários anos no solo (BEDENDO, 2011), o que dificulta o seu controle, podendo inviabilizar e até mesmo causar o abandono da atividade na estufa (VIDA *et al.*, 2004). Os escleródios ao germinarem de forma miceliogênica podem causar tombamentos em pré e pós-emergência em plântulas de pepino (ETHUR *et al.*, 2005).

O controle químico de sementes e do solo são as principais medidas utilizadas para controlar este tipo de patógeno. No entanto, Schwan-Estrada (2009) relata que o uso intensivo e indiscriminado de agroquímicos, ocasiona diversos problemas ambientais, relacionados à contaminações diversas; intoxicação de trabalhadores rurais; eliminação de organismos benéficos e o surgimento de resistência de patógenos a seus ingredientes ativos.

As plantas medicinais podem ser exploradas na obtenção de pesticidas naturais, pelo uso de seus extratos brutos e/ou óleos essenciais (MORAIS, 2009), cujo potencial no controle de fitopatógenos, pode ocorrer tanto por sua ação fungitóxica direta, quanto pela indução de componentes de defesa vegetal, evidenciando seu caráter muitas vezes elicitador (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2000). Smith (1996) relata que elicitores são moléculas de

qualquer origem, quer seja biótica ou abiótica, capazes de estimular respostas de defesa nas plantas.

Trabalhos *in vitro* relatam o potencial antifúngico de erva-lúisa (*Aloysia citriodora* Palau) (DUARTE *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2004; COMBRINCK *et al.*, 2011; LOZADA *et al.*, 2012; BOUCHRA *et al.*, 2003), entretanto, são escassos ou inexistentes, os que relatam sua atividade antifúngica a *S. sclerotiorum*, bem como sua aplicação prática no controle a campo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de *A. citriodora* no controle dos tombamentos de plântulas de pepino causados por *S. sclerotiorum* e evidenciar se o efeito advém da atividade antifúngica/fungistática direta ou por indução de mecanismos bioquímicos de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos *in vitro*

O óleo essencial das plantas de *A. citriodora* foi extraído em maio de 2014, coletando as plantas nas primeiras horas do período da manhã. A extração foi feita em aparelho de hidrodestilação, modelo Clevenger. O isolado utilizado foi obtido a partir de escleródios de *S. sclerotiorum*, os quais foram transferidos para meio BDA (batata dextrose ágar). A incubação foi feita em câmara de crescimento a 24 °C ± 1 °C, com fotoperíodo de 12 horas, repicando-se o micélio até a obtenção de colônias puras do fungo.

O primeiro experimento *in vitro* consistiu em avaliar o crescimento radial em cm do patógeno em placas de Petri, contendo concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA (0,01%; 0,03%; 0,06%; 0,12%; 0,25% e 0,50%) mais a testemunha (meio BDA puro). Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo considerada como repetição, cada placa de Petri utilizada (8 cm φ).

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. 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 acondicionadas em câmara de crescimento, na temperatura de 24 °C ± 1 °C e fotoperíodo de doze horas. O experimento foi encerrado quando a primeira placa foi atingida nas bordas pelo crescimento radial do fungo (72 horas de crescimento).

No segundo experimento *in vitro*, avaliou-se o índice de velocidade de germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, em função de concentrações (0,01%; 0,03%; 0,06%; 0,12%; 0,25%) de óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA, mais a testemunha (BDA puro), em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo considerada como repetição uma placa de Petri (8 cm φ), contendo dez escleródios por placa. As placas foram tampadas e acondicionadas em câmara de crescimento, com temperatura de 24 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas, por oito dias.

Experimento *in vivo*

No terceiro experimento, avaliou-se o efeito do tratamento das sementes de pepino com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (0,06%; 0,12% e 0,25%), 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 cem células de 0,03 cm³ cada. As células receberam substrato inoculado com micélio de *S. sclerotiorum* produzido em grãos de trigo autoclavados.

O substrato utilizado no experimento foi da marca Tecnomax[®] para horticultura, sendo previamente desinfestado em autoclave por quarenta minutos a 120 °C. Após a desinfecção, os grãos de trigo miceliados com o inóculo, foram misturados ao substrato, na quantidade de 20 g Kg⁻¹, o qual foi colocado nas bandejas de isopor, dez dias antes da semeadura do pepino, com irrigações diárias, com a finalidade de proliferar o patógeno nas unidades experimentais.

Utilizaram-se sementes de pepino ‘Wisconsin SMR 18’ com 97% de poder de germinação, sem tratamento químico comercial, sendo previamente desinfestadas por cinco minutos 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, sendo em seguidas tratadas com 10 mL de cada tratamento para 100 sementes.

A semeadura foi feita colocando-se uma semente por célula, logo após o tratamento com o óleo essencial. As bandejas foram colocadas na Câmara de Crescimento, à temperatura de 25 °C ± 2 °C e 65% ± 10% de umidade relativa, por oito dias. Foram realizadas duas avaliações, de acordo com as Regras para Análises 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 (TPE). 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 desta foram expressos em porcentagem de emergência, porcentagem de TPE, comprimento médio de plântulas e massa fresca média por plântula.

Ao final do experimento, separou-se material vegetal misto de raízes e parte aérea das plântulas de pepino, que foram armazenadas em freezer a -20 °C até as avaliações bioquímicas. As avaliações bioquímicas realizadas foram as seguintes: teor de proteínas totais (BRADFORD, 1976); atividade enzimática de peroxidases (MATSUNO; URITANI, 1972); fenilalanina amônia-liase (FAL) (HYODO *et al.*, 1978; RODRIGUES *et al.*, 2006); β-1,3-glucanases e quitinases (GUZZO *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio de teste de normalidade de Lilliefors, análise de variância e testes complementares (análise de

regressão), a 5% de probabilidade. Dados que não atenderam os pressupostos do modelo matemático foram avaliados por desvio padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi afetado negativamente pelo uso de óleo essencial de *A. citriodora* no meio BDA, mesmo nas menores doses testadas (Figura 1). 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*, reduziram o crescimento do fungo *Moniliophthora roreri*, causador de monilíose em cacau, na dose de 0,2% e causou inibição total do micélio do patógeno, nas concentrações de 0,8% a 1%.

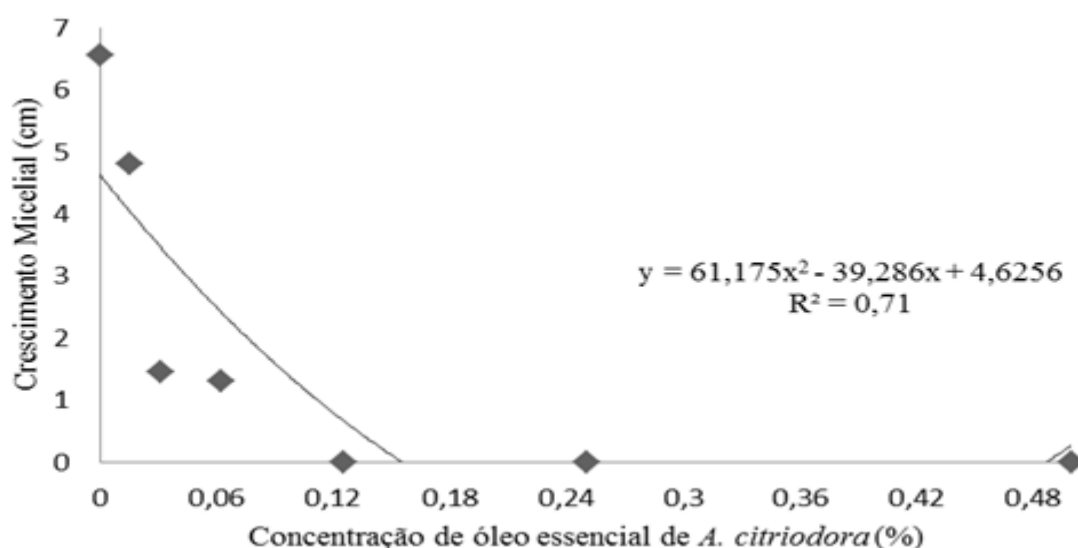


Figura 1. Crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em placas de Petri® contendo meio BDA, 72 horas após incubação em câmara de crescimento a 24 °C ± 1 °C e fotoperíodo de 12 horas.

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

Bouchra *et al.* (2003), relataram que na concentração de 0,02% 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 0,02% 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/fungistático na concentração de 0,25%, observado pelo cálculo do seu índice de velocidade de germinação (Figura 2).

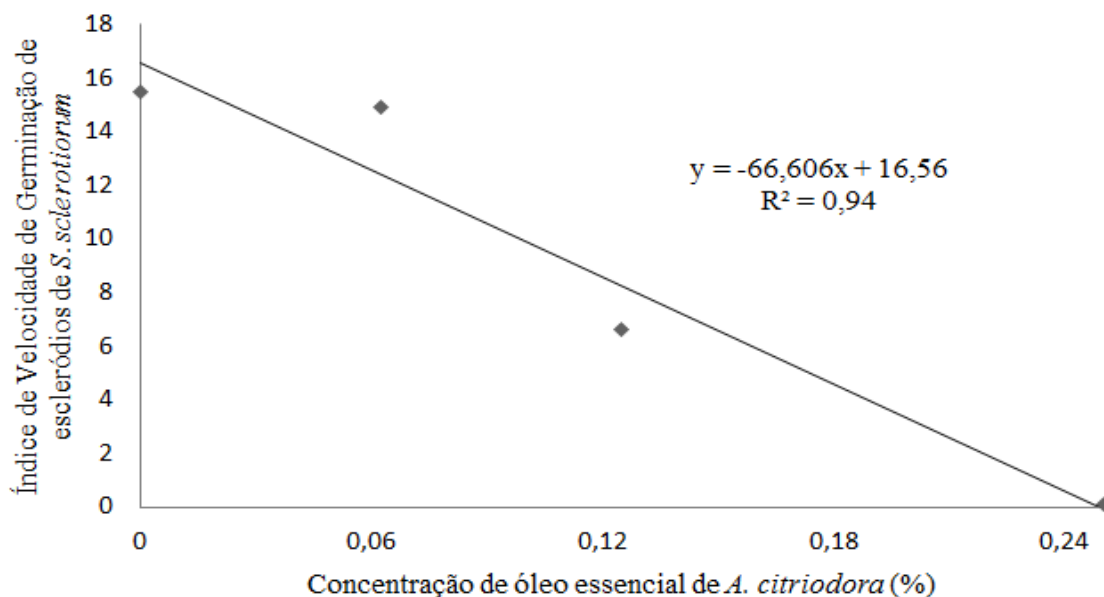


Figura 2. Índice de velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, em função de concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* em meio BDA, oito dias após incubação em câmara de crescimento a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro.

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 (AGGARVAL *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).

Em substrato contaminado com micélio de *S. sclerotiorum*, a porcentagem de emergência de plântulas de pepino aos quatro e nove dias, não foram influenciadas significativamente pelo tratamento das sementes com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 3). Os tombamentos de pré-emergência não ocorreram muito provavelmente pelo fato do patógeno não ter atuado nesta fase de desenvolvimento das

plântulas, pois o lote de sementes testado, possuía poder germinativo de 97%, que foi o valor mínimo de emergência obtido no presente experimento.

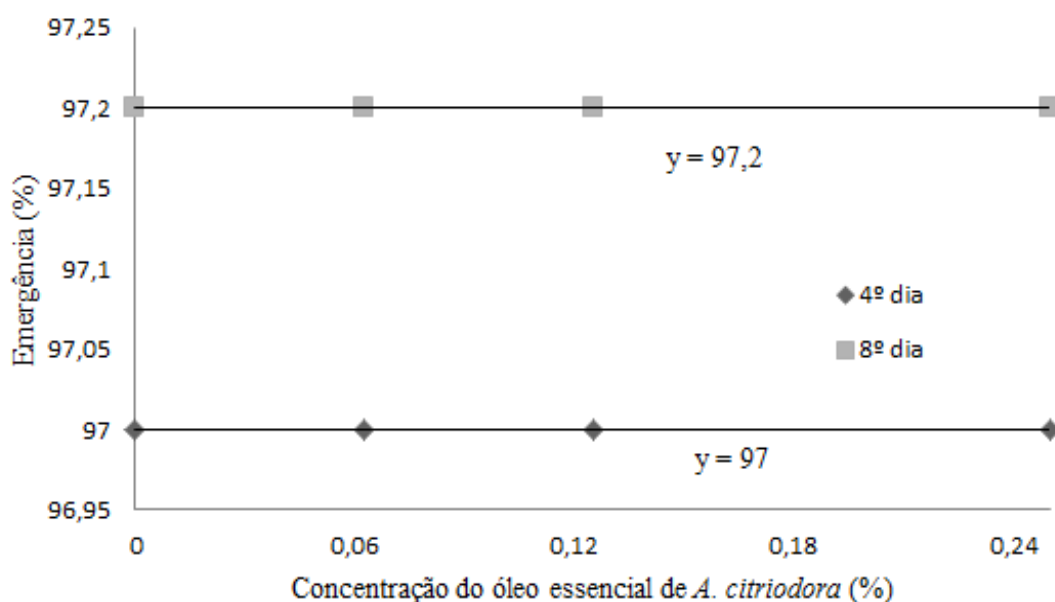


Figura 3. Porcentagem de emergência aos quatro e oito dias de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias.

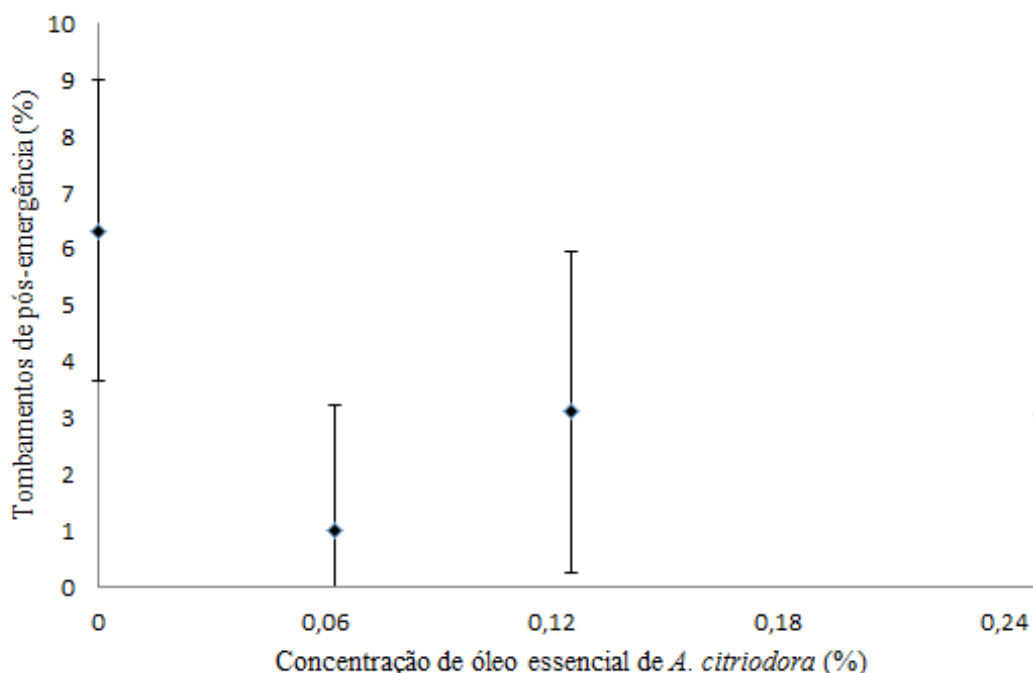


Figura 4. Tombamentos pós-emergência (TPE) aos oito dias de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias.

Com relação ao tombamento de plântulas de pepino em pós-emergência (TPE), estes foram observados no experimento até oito dias após a semeadura. O uso do óleo essencial de *A. citriodora* diminuiu a ocorrência dos TPE com relação à testemunha do experimento, sendo que somente no tratamento das sementes com 0,06% esta variável foi estatisticamente significativa (Figura 4).

Nas variáveis massa verde e comprimento de plântulas, não houve influência significativa pelo tratamento das sementes com o óleo essencial (Figura 5). Ou seja, o uso do produto não foi favorável para o desenvolvimento das plântulas de pepino no presente trabalho e também não inibiu o seu crescimento, o que pode ser considerado positivo. Óleos essenciais têm sido relatados com efeitos alelopáticos a plantas quando aplicados às sementes, como por exemplo, no trabalho de Rosado et al. (2009), onde os autores observaram que o óleo essencial de manjeriço (*Oncimum basilicum* L.) inibiu o índice de velocidade de germinação, comprimento de raízes e a porcentagem de germinação de alface, tomate e melissa.

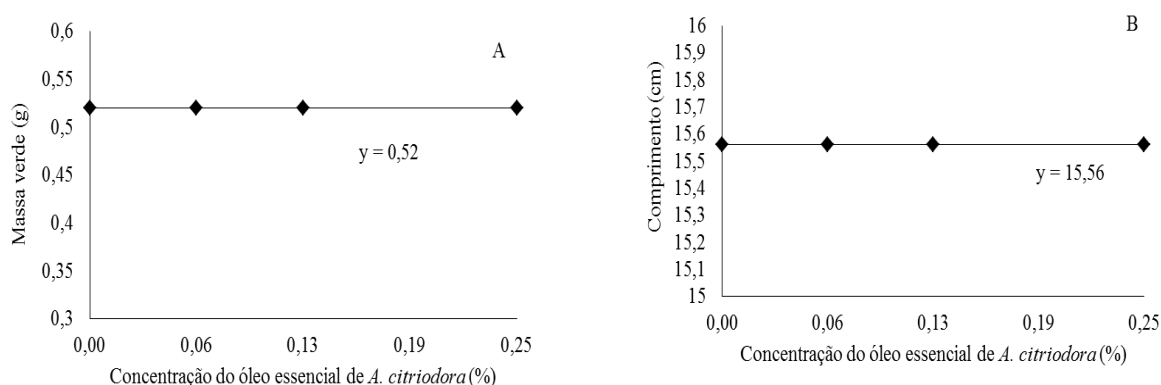


Figura 5. Massa verde média por plântula (A) e comprimento médio de plântulas (B) de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\%\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias.

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 6A). Não houve diferenciação dos tratamentos com a testemunha, no entanto, o tratamento das sementes com 0,06% de óleo essencial foi estatisticamente superior ao tratamento de maior dose (0,25%) (Figura 6A). Este resultado pode estar relacionado com os resultados obtidos com os TPE, onde houve menor valor desta variável no tratamento das sementes com 0,06% de óleo essencial de *A. citriodora* (Figura 4), ou seja, quanto maior o teor de proteínas dos tecidos das plântulas de pepino, menor número de TPE ocorreram.

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 6B), 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).

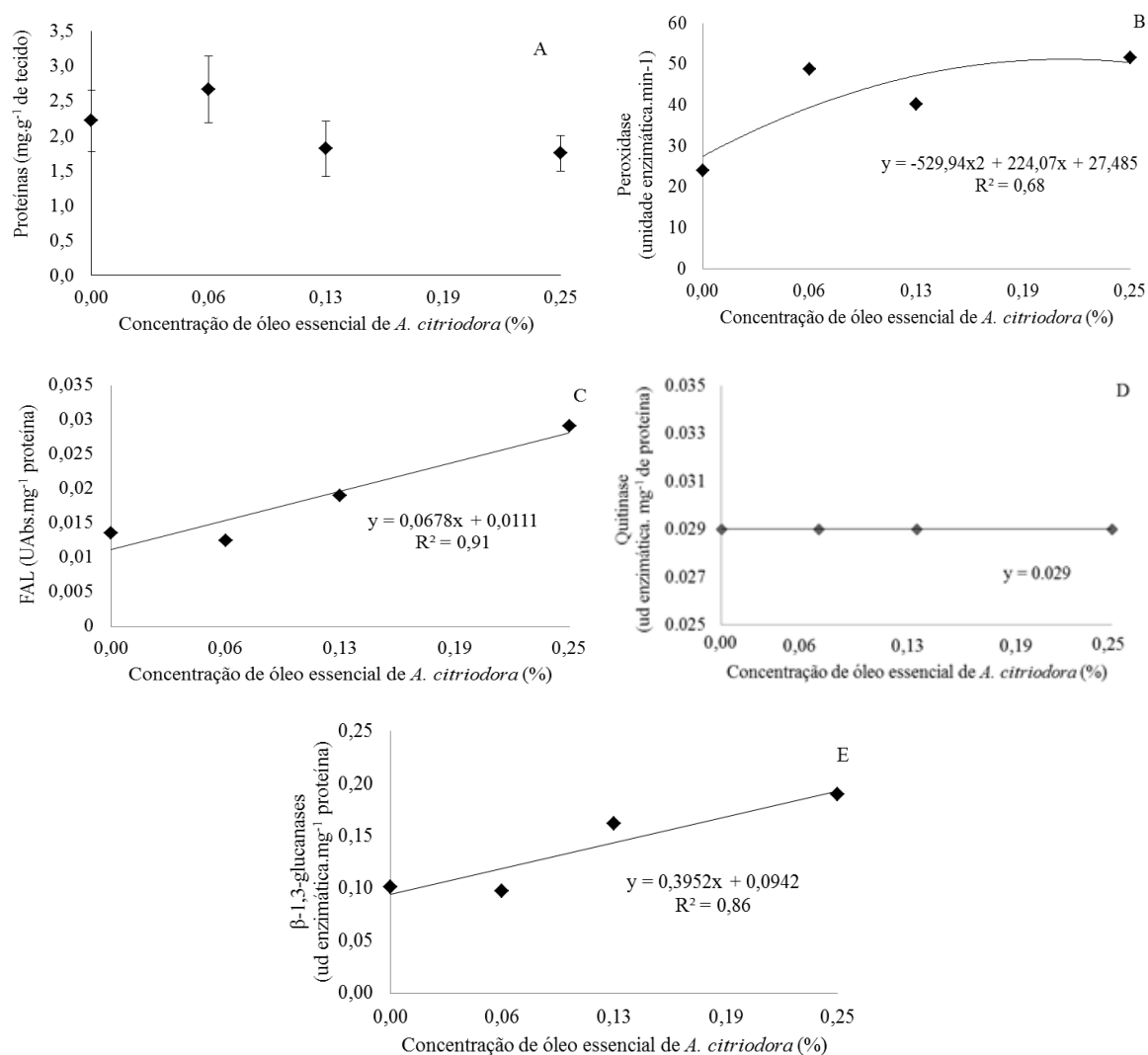


Figura 6. Atividade bioquímica dos tecidos vegetais (folhas e raízes) de plântulas de pepino cv. Wisconsin SMR 18, em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, com as sementes tratadas com concentrações de óleo essencial de *A. citriodora*, incubadas em câmara de germinação a 25°C±1°C e umidade relativa de 65%±10%, fotoperíodo de 12 horas, por oito dias. A: teor de proteínas; B: atividade enzimática de peroxidases; C: FAL; D: quitinases; E: β-1,3-glucanases.

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) foi influenciada significativamente pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *A. citriodora* de forma linear crescente com o aumento da concentração (Figura 6C). 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).

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 6D). Ao contrário, algumas pesquisas demonstram que óleos essenciais têm induzido o aumento da atividade enzimática de quitinases, como exemplo tem-se a videira, pela aplicação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (MAIA *et al.*, 2014).

Já a atividade enzimática de β -1,3-glucanases foi influenciada pelo tratamento das sementes com *A. citriodora*, sendo que, assim como no resultado obtido para FAL, observou-se aumento linear crescente desta variável, com o aumento da concentração do produto utilizado (Figura 6E).

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. As β -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 por exemplo em canola (FERNANDO *et al.*, 2007) e em alcachofra (MARCUCCI *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

O uso do óleo essencial no tratamento de sementes de pepino, na concentração de 0,06%, colaborou na redução da incidência de tombamentos de pós-emergência em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*. Este resultado pode estar atribuído à atividade fungistática ou fungicida direta, observados no teste *in vitro* realizados no primeiro trabalho.

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

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**, Chichester, 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**, Grand Forks, v. 10, n. 11, p.3044-3053, 2011.

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

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**, New York, v. 72, n. 1-2, p.248-254, 1976.

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

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**, Firenze, v. 42, n. 3, p.251-256, 2003.

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**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p.344-349, 2011.

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

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.

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**, Guildford, 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
Cultura Agronômica, Ilha Solteira, v.25, n.4, p.373-386, 2016

antracnose em pepino e do crestamento bacteriano em feijão. **Cadernos de Agroecologia**, Recife, v. 6, n. 2, p.1-5, 2011.

GARCIA, A. Á.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia)**, Madrid, 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.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

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, n. 9-10, 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**, Minneapolis, v. 62, n. 1, 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**, Den Haag, v. 158, n. 3, p.343-349, 2004.

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**, Bogotá, v. 61, n. 2, p.94-102, 2012.

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

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**, Berlin, 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**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 35, p. 149-206.

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. 13, n. 6, 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**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, p.878-884, 2009.

Cultura Agrônômica, Ilha Solteira, v.25, n.4, p.373-386, 2016

- 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, 2009. cap. 9, p. 139-152.
- 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**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-636.
- PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, Cambridge, v. 89, n. 358, 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**, Viçosa, 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**, Porto Alegre, 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**, Brasília, v. 28, n. 2, p.123-130, 2003.
- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium 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.
- ROSADO, L. D. S.; RODRIGUES, H. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; CUSTÓDIO, T. N.; PINTO, L. B. B.; BERTOLUCCI, S. K. V. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjerição “Maria Bonita” na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 11, n. 4, p.422-428, 2009.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, 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**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p.129-137, 2000.
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, Oxford, 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**, Marechal Cândido Rondon, 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**, Brasília, v. 29, n. 4, p.355-372, 2004.