

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

INTERAÇÃO PATÓGENO – HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA CAPIM
LIMÃO – FERRUGEM DAS FOLHAS E AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES
ATIVOS NATURAIS NO CONTROLE DA DOENÇA

EMI RAINILDES LORENZETTI

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
Título de Mestre em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU-SP
Fevereiro - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

INTERAÇÃO PATÓGENO – HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA CAPIM
LIMÃO – FERRUGEM DAS FOLHAS E AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES
ATIVOS NATURAIS NO CONTROLE DA DOENÇA

EMI RAINILDES LORENZETTI
Engenheira-Agrônoma

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do Título de
Mestre em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU-SP
Fevereiro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L869i Lorenzetti, Emi Rainildes, 1983-
Interação patógeno-hospedeiro no patossistema campim limão - ferrugem das folhas e avaliação de ingredientes ativos naturais no controle da doença / Emi Rainildes Lorenzetti. - Botucatu : [s.n.], 2009.
ix, 78 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento
Inclui bibliografia.

1. Fitopatologia. 2. Fotossíntese. 3. Plantas medicinais. 4. Ferrugem. 5. Capim-limão - Doenças - Controle. I. Sacramento, Luis Vitor Silva. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "INTERAÇÃO PATÓGENO - HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA CAPIM-
LIMÃO x FERRUGEM DAS FOLHAS E AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES
ATIVOS NATURAIS NO CONTROLE DA DOENÇA"**

ALUNO: EMI RAINILDES LORENZETTI

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO

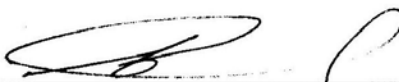
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. LUÍS VITOR SILVA DO SACRAMENTO



PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES



DR. CELSO DORNELLAS FERNANDES

Data da Realização: 06 de fevereiro de 2009.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.”

Cora Coralina

***Com toda admiração à meus pais
Fumie Eiri e Rui Lorenzetti exemplos
de coragem.***

AGRADECIMENTOS

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” Cora Coralina

A Deus, mestre dos mestres, pela proteção e por mostrar-me sempre os melhores caminhos a seguir.

Ao Prof. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelo exemplo de simplicidade, pela confiança depositada, toda a paciência com a minha impaciência e pela transmissão de conhecimentos, orientação e amizade.

Ao Prof. Edson Luiz Furtado pelas dúvidas esclarecidas e pela disponibilidade em ensinar.

A Professora Sarita Leonel, exemplo de profissionalismo, pela atenção e auxílio.

Aos Professores João Domingo Rodrigues, Elisabeth Orika Ono, Carmen Boaro, Antônio Ismael Cardoso, Ana Maria Soares Pereira, Bianca Berton e Marta Mischan por auxiliarem no conhecimento dos caminhos da ciência nesta etapa de formação.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e colaboração no aprimoramento deste trabalho.

“Não sei, se a vida é curta ou longa demais, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas” Cora Coralina

Aos grandes amigos: Danila Conceição pelos momentos de alegria e de tristeza, por toda a ajuda nos experimentos e as idas e vindas de Araraquara. Andrea Carvalho, pela ajuda nos experimentos e por ter me mostrado os caminhos da religiosidade que andavam esquecidos. Baiana (Thaise Ribeiro Dias) pelos dois anos de convivência e pelo exemplo de seriedade no trabalho. Rosilaine Araldi, Adriana Tanaka, amigas de hoje e sempre, pela alegria de todos os dias. Adilson Pacheco, pelo exemplo de profissionalismo. Simone Ciavatta, exemplo de trabalho sério juntamente com uma alegria incrível. Alex Sander Porcena, pela assessoria em informática.

Sem esquecer de todos os outros grandes amigos somados nestes dois anos de Botucatu: Camila, Luis Vitor – Mexicano, Manoel, Edvar, Juracy, Mauricio, Paola e Bryan, Rigléia (Lagarta), Francine, Giovana, Quésia, Augusto, Felipe Magro e Karina.

Aos estagiários de Araraquara, pela amizade e todo o auxílio nos trabalhos, Camila, Vitor e Luis Antônio.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.” Cora Coralina

A Maria Angélica Barreto, técnica do Lab. de Botânica, pela atenção e pelo auxílio em todas as etapas dos trabalhos.

Ao pesquisador Aníbal Carvalho, do Jardim Botânico do RJ, pela atenção e pela identificação do fungo e a Profa. Cássia Sakuragui, pela longa amizade e por todo o incentivo desde a graduação.

Aos Funcionários da Horticultura, da Pós-graduação e da Diretoria pelo auxílio nas pesquisas e apesar das dificuldades, por serem atenciosos e tentarem ajudar sempre que possível.

Aos Funcionários da Fazenda de São Manuel, Nilton, Paschotto, Cido, Lourenço e todos os outros que sempre auxiliaram prontamente nos serviços realizados em campo.

Aos Funcionários do Transporte, Jairo, Bahia, Sérgio, Ricardo e outros, pela atenção e pelas idas e vindas em segurança.

Aos Funcionários da Biblioteca, Denise, Solange, Joel e outros pelo ótimo atendimento em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Horticultura) FCA/UNESP, pela oportunidade de realização desta etapa de formação e por todos os conhecimentos adquiridos.

Ao Brasil representado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Por todos que de uma forma ou de outra auxiliaram nos trabalhos em Botucatu.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Técnicas de produção agrícola	8
2.2. Interação Patógeno – Hospedeiro	10
2.2.1. As defesas das plantas	10
2.2.2. Características anatômicas e sua influência na infecção por patógenos.....	11
2.2.3. Influência de patógenos na taxa fotossintética da planta.....	12
2.3. Cultivo de plantas medicinais.....	13
2.4. Agentes de controle alternativo de doenças em plantas	17
2.5. A espécie <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	21
2.6. A ferrugem do capim-limão	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Interação patógeno – hospedeiro	28
3.1.1. Identificação do Patógeno	28
3.1.2. Anatomia foliar.....	29
3.1.3. Medidas de Trocas Gasosas.....	29
3.1.4. Óleo essencial em plantas afetadas por <i>P. nakanishikii</i>	31
3.2. Estabelecimento de estratégias de controle da doença	32
3.2.1. Testes <i>in vitro</i> para a inibição da germinação de esporos de <i>P. nakanishikii</i>	32
3.2.2. Testes em campo para o controle de <i>P. nakanishikii</i>	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Identificação do patógeno.....	38
4.2. Anatomia de folhas infectadas de capim-limão.....	40
4.3. Trocas gasosas em Capim-limão afetado por <i>P. nakanishikii</i>	44
4.4. Óleo essencial em capim-limão afetado por <i>P. nakanishikii</i>	50

4.5. Testes <i>in vitro</i> para a inibição da germinação de esporos de <i>P. nakanishikii</i>	52
4.6. Testes em campo para a inibição da germinação de esporos de <i>P. nakanishikii</i>	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas químicas dos componentes do Citral	24
Figura 2.	Pluviosidade e Temperaturas Médias na época de realização do experimento (dez-07 a out-08) – São Manuel - SP.....	28
Figura 3.	Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade da doença.....	30
Figura 4.	Vista geral do Experimento. A: no plantio em 27/02/2008 B: seis meses após o plantio em 22/08/2008.....	35
Figura 5.	Aspecto geral do experimento. A: após dez dias da colheita B: trinta dias após a colheita	37
Figura 6.	Sintomas e estruturas de <i>Puccinia nakanishikii</i> Dietel.	39
Figura 7.	Imagens de indivíduo de capim-limão afetado por <i>Puccinia nakanishikii</i>	41
Figura 8.	Cortes histológicos de capim-limão e capim-limão infectado por <i>P. nakanishikii</i>	43
Figura 9.	Assimilação líquida de CO ₂ em folhas de capim-limão com diferentes severidade de ferrugem para a primeira avaliação – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.	45
Figura 10.	Assimilação líquida de CO ₂ em folhas de capim-limão com diferentes severidade de ferrugem para a segunda avaliação – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.	46
Figura 11.	Condutância Estomática e Concentração Interna de CO ₂ para a primeira avaliação em diferentes severidades da ferrugem em folhas de capim limão – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.	48
Figura 12.	Condutância Estomática e Concentração Interna de CO ₂ para a segunda avaliação em diferentes severidades da ferrugem em folhas de capim limão – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.	49
Figura 13.	Rendimento de óleo essencial (%) em capim-limão nas diferentes severidades de ferrugem. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.....	51
Figura 14.	Aspecto geral das drogas vegetais originadas do experimento de capim-limão (<i>C. citratus</i>) empregado para a avaliação de agentes controladores da ferrugem em campo, em pleno cultivo.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de germinação de esporos de <i>P. nakanishikii</i> submetidos a diferentes agentes de controle e concentrações de princípios ativos. FCA/ Unesp – Botucatu – SP, 2008.....	53
Tabela 2. Germinação de Esporos de <i>P. nakanishikii</i> submetidos a diferentes agentes de controle em concentrações de princípios ativos. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.	55
Tabela 3. Princípios ativos no controle da ferrugem do capim-limão em condições de campo. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.	57

**INTERAÇÃO PATÓGENO – HOSPEDEIRO NO PATOSSISTEMA CAPIM LIMÃO –
FERRUGEM DAS FOLHAS E AVALIAÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS
NATURAIS NO CONTROLE DA DOENÇA**

AUTORA : Emi Rainildes Lorenzetti

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

RESUMO

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf é uma gramínea perene, de grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia, fornecedora de óleo essencial. Um problema limitante para a produção comercial é a ferrugem, causada pelo patógeno *Puccinia nakanishikii* Dietel. O trabalho objetivou estudar a interação patógeno-hospedeiro e avaliar princípios ativos naturais no controle da doença. Para os estudos anatômicos foram elaborados cortes, objetivando analisar as estruturas lesionadas e o desenvolvimento do patógeno. Foram avaliadas as trocas gasosas nas diferentes severidades da doença. Realizaram-se testes *in vitro*, com diferentes agentes de controle sobre a germinação de esporos do patógeno, sendo estes: óleos essenciais de eucalipto, palma-rosa, cravo-da-índia, menta, limão, citronela e mil-folhas; extrato pirolenhoso de eucalipto e mentol cristalizado. A partir destes testes foram escolhidos quatro agentes para os testes em campo, óleo de citronela e de eucalipto, extrato pirolenhoso e mentol. A área foi preparada a partir de mudas, sendo manejadas até os seis meses. Quando todas as plantas apresentavam sintomas, iniciaram-se os tratamentos com aplicações semanais. Foi avaliada ainda a doença após um corte. Os sintomas iniciais manifestam-se como manchas amareladas evoluindo para a formação de pústulas bronzeadas alongadas. Quanto à avaliação anatômica, após a infecção houve o desenvolvimento das estruturas fúngicas, prosseguindo com o rompimento da cutícula, possibilitando a observação das estruturas do patógeno de forma clara sobre as células da epiderme. Nas regiões lignificadas dos feixes vasculares não há desenvolvimento dessas estruturas. Com o aumento da severidade da doença observou-se a redução da assimilação de gás carbônico. A concentração interna de gás carbônico foi maior

em severidades mais altas. Tal fato relaciona-se com a presença do fungo na mesma porção de folha. O emprego dos óleos essenciais, extrato pirolenhoso e mentol mostrou-se promissor como forma de controle da doença em condições *in vitro*. Quando em condições *in vivo*, a doença mostrou-se de difícil controle em plantas adultas, apesar dos tratamentos demonstrarem redução da severidade. Houve estabilização da progressão da doença com as aplicações dos produtos quando do surgimento dos primeiros sintomas. É necessário desenvolvimento de formulações e formas mais eficientes de aplicação dos produtos para o controle da doença em estádios avançados.

PALAVRAS CHAVE: controle alternativo, fotossíntese, óleos essenciais, *Puccinia*, *Cymbopogon*, ferrugem, plantas medicinais.

PATOGEN- HOST INTERACTION IN THE PATOSSISTEM LEMONGRASS – LEAF RUST AND ACTIVE INGREDIENTS EVALUATION TO THE DISEASE CONTROL. Botucatu, 2009, 78p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author : Emi Rainildes Lorenzetti

Adviser: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

SUMMARY

Cymbopogon citratus (DC) Stapf is a perennial grass, that has a large importance to the pharmaceutical and food industry, supplier of essential oil. One limiting problem to the commercial production is the rust caused by pathogen *Puccinia nakanishikii* Dietel. This work aimed to investigate the pathogen-host interactions and contribute to the researches with alternative methods of disease control. For anatomical studies were prepared anatomical sections, with the objective to analyze the structures injured and the development of the pathogen with different corants. On cultivated plants were evaluated gas exchange in different severity levels. In vitro tests were performed with different control agents, to the germination of pathogen spores, which are: essential oil of eucalyptus, palmarosa, clove, peppermint, lemon, citronella and yarrow; pyroligneous extract of eucalyptus and crystallized menthol. From these tests four products were chosen for the tests in a camp experiment, citronella oil, eucalyptus oil, pyroligneous extract and menthol. The area was prepared from seedlings, which were managed by six months age. When all plants had symptoms the treatments begin, with weekly applications. One avaliation happened after the cut of the lemongrass. The initial symptoms manifest as yellow spots progressing to formation of elongated pustules. These symptoms beginning with the development of fungal structures, after occurred the disruption of the cuticle, so the structures of the pathogen may be clearly observed on epidermis parenchyma cells of the leaf abaxial surface, however, in regions of vascular bundles, no development of such structures, these regions that have lignified structures. With the increase of the disease severity was a significant reduction in the assimilation of carbonic gas. The internal concentration of carbon dioxide was major in higher levels of severity. This fact is

related to the presence of the fungus on the same piece of leaf. The use of essential oils from plants, pyroligneous extract and menthol solution showed promising ways of controlling the disease under conditions in vitro. When conditions in vivo, the disease was difficult to control, in adult plants, in which the disease was already established, the treatments were not efficient in the form that were applied. When reporting the first symptoms and the applications made with the products, there was stabilization of disease progression. There are necessary to know more efficient ways of apply products for which there is a more efficient control of the disease, and more specific methodologies that allow the disease quantification. The cut of this plant in 45 days of development were efficient to control the disease.

KEY WORDS: alternative control, photosynthesis, essential oils, *Puccinia*, *Cymbopogon*, rust disease, medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

A prática agrícola foi iniciada com os primórdios da civilização humana, acredita-se que cerca de dez mil anos atrás. O homem passou a domesticar espécies vegetais alterando as condições naturais em que estas se desenvolviam e adaptá-las a condições de cultivo, tornando-as, às vezes, menos resistentes a pragas e patógenos, que antes conviviam em equilíbrio. As condições de cultivo muitas vezes rompiam com a linha de equilíbrio entre os organismos de um ecossistema tornando uma doença, por exemplo, um sério problema para as culturas que se tornavam de importância.

Com o passar dos séculos, cada vez mais, o equilíbrio existente entre os organismos foi sendo alterado. Com a necessidade de alimentar uma população cada vez maior, novas estratégias de produção surgiram embasadas no contexto da Revolução Verde. Assim, os patógenos tornaram-se incômodos a produção agrícola (MIZUBUTTI & MAFFIA, 2001). Zambolim et al. (2008) demonstram que as perdas com pragas e doenças tornam-se mais preocupantes quando se comparam os países em desenvolvimento com países desenvolvidos, estimando-se que em países em desenvolvimento as perdas com doença cheguem a 27% enquanto para países desenvolvidos esse valor é de mais ou menos 14%.

Dentre as novas tecnologias implementadas com a Revolução Verde enquadram-se insumos com alto custo energético, como adubos e produtos químicos para controlar fungos, pragas e plantas daninhas, além de desigualdades econômicas e sociais, aliadas a problemas ambientais.

Visando a redução do impacto ambiental causado por essas novas tecnologias surgiram correntes de agricultura que remontavam às práticas empregadas nas

origens da domesticação de plantas. Algumas dessas correntes são a agricultura orgânica, biodinâmica e natural (SANTOS & MENDONÇA, 2001). Inseridas nestas correntes agrícolas estão técnicas alternativas para o controle de doenças em plantas, sendo que, na maioria das vezes, estas técnicas são empregadas conjuntamente, mas sempre observando e manejando a tríade, ambiente, hospedeiro e patógeno.

O reino vegetal em sua evolução utilizou-se de inúmeros mecanismos que permitiram sua permanência e domínio da paisagem. Dentre estes mecanismos são encontradas as substâncias químicas oriundas do metabolismo secundário. Tais substâncias tornam-se importantes por serem caracteres que diferenciam espécies, mais importante ainda por servirem como defesa contra agentes externos, como animais, insetos, patógenos e mesmo contra outras espécies de plantas. Estes mecanismos tornam-se de fundamental importância ao considerar-se que as plantas são sésseis, não podendo como os animais, moverem-se de lugar quando em situação de perigo.

Um maior conhecimento entre as interações existentes entre patógenos e hospedeiros pode auxiliar na elaboração de estratégias que visem o manejo de determinadas enfermidades. Aliado a isto, técnicas de controle alternativo de doenças podem auxiliar no equilíbrio do ambiente permitindo a convivência com as doenças mantendo as culturas economicamente viáveis.

Paralelamente à agricultura, as plantas eram empregadas em outros aspectos da vida do homem, dentre estes, tinham finalidades curativas, as chamadas plantas medicinais. Desde os mais remotos momentos da existência humana há relatos do emprego de plantas pelas propriedades curativas, antes consideradas mágicas, hoje tendo conhecidos seus efeitos medicinais, obtidos através de determinadas substâncias oriundas de seu metabolismo.

Para o cultivo comercial de plantas medicinais, com mercado exigente e que necessita de boa qualidade, é aconselhável que sejam empregadas técnicas como as adotadas pela agricultura orgânica, menos agressivas ao ambiente e fornecem produtos sem a possibilidade de contaminação por agroquímicos.

O capim-limão (*Cymbopogon citratus*), uma gramínea de origem asiática, é utilizado pela cultura popular na forma de infuso, principalmente como calmante e espasmolítica. Cultivada em todas as regiões do país, está difundida na maioria das áreas tropicais do mundo. Além da importância medicinal, destaca-se como uma grande produtora

de óleo essencial, muito utilizado pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. No Brasil, a produção comercial destaca-se nos estados do Sudeste e Sul, notadamente no Paraná e em São Paulo.

Nos últimos anos, em áreas de cultivo da espécie, foi observada a ocorrência de uma doença que promove manchas necróticas e rapidamente dissemina-se por toda a área. Essa doença é a ferrugem do capim-limão, tendo sido relatada pela primeira vez, no Estado do Paraná, por Vida et al. (2006). Também foi notificada nos Estados do Rio de Janeiro e em São Paulo.

A doença atinge as folhas, reduzindo o desenvolvimento da planta e afetando a qualidade do produto final. Neste contexto, formas de controle da doença são muito necessárias, sendo poucos os estudos com doenças em plantas medicinais bem como as alternativas para os produtores manejarem esta enfermidade.

Desta forma, o presente trabalho objetivou:

- Estudar a interação entre patógeno-hospedeiro, avaliando características anatômicas e fisiológicas de plantas de capim – limão infectado pela ferrugem
- Avaliar princípios ativos naturais no controle da doença em condições controladas (*in vitro*) e em campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Técnicas de produção agrícola

Apesar de se confundir com a própria história do Homem, a prática agrícola, a cada dia, conta com inovações que buscam melhorar aspectos produtivos tanto para aumentar a produção quantitativamente, quanto aprimorar aspectos qualitativos relacionados ao processo produtivo. Anteriormente, as práticas agrícolas eram diversificadas e exploravam-se várias espécies vegetais. Com o desenvolvimento da humanidade, aos poucos, novas espécies, antes selvagens, foram adaptadas para que pudessem ser cultivadas atendendo às suas necessidades (GLIESSMAN, 2001).

Quando o homem desenvolveu a escrita, a notável capacidade do cultivo já havia sido desenvolvida, a qual lhes permitia a sedentarização, estabelecendo relações sociais complexas, formando as antigas civilizações conhecidas na história da humanidade como os persas, egípcios, romanos e gregos (KHATOUNIAN, 2001).

Com o avanço das ciências, principalmente da química, novas formas de produção foram estabelecendo-se no ambiente rural. Uma das práticas mais utilizadas até então, para a fertilização dos solos era o pousio, substituída com o estabelecimento de fertilizantes minerais, que resolviam rapidamente o problema dos solos esgotados. Com o aumento de pragas e doenças surgem novos produtos que combatiam prontamente os problemas que levavam a redução das colheitas. A década de 1970 completa o pacote de insumos químicos, tornando a agricultura dependente da indústria química e transformando profissionais e agricultores em seguidores de modelos pré-definidos (KHATOUNIAN, 2001).

A modernização da agricultura, apesar das novas tecnologias e facilidades para o agricultor, trouxe conseqüências desagradáveis em vários aspectos, dentre eles o ecológico. Em contraposição ao emergente modelo químico surgiam movimentos que retomavam práticas agrícolas utilizadas no princípio da agricultura, segundo diferentes filosofias (SANTOS & MENDONÇA, 2001).

Além disso, novos conceitos passaram a ser empregados para designar as práticas ditas de uma forma geral como orgânicas. Dentre estes conceitos empregados cita-se a agroecologia.

A agroecologia pode ser resumida em uma união de diversos ramos da ciência com elementos sociais, humanos, respeitando-se o conhecimento tradicional. Preconiza-se, na agroecologia, o estudo das bases ecológicas (estruturas e funções) dos sistemas agrícolas e a aplicação de conceitos ecológicos na concepção e manejo desses sistemas (GLIESSMAN, 2001).

Agroecologia trata-se de uma orientação cujas contribuições vão muito além de aspectos meramente tecnológicos ou agrônômicos da produção, incorporando dimensões mais amplas e complexas, que incluem tanto variáveis econômicas, sociais e ambientais, como variáveis culturais, políticas e éticas da sustentabilidade. Por esta razão o processo de transição agroecológica não dispensa o progresso técnico e o avanço do conhecimento científico (CAPORAL, 1998; CAPORAL & COSTABEBER, 2000).

Através de incentivos governamentais estabelecidos nos últimos anos, principalmente a partir da Instrução Normativa nº 007, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União em 19/05/1999 (BRASIL, 1999) e pela aprovação da Lei de Orgânicos nº 10831 em dezembro de 2003, motivada pela organização do setor produtivo, a produção orgânica cresceu em importância no cenário nacional (SOUSA & RESENDE, 2006).

Recentemente, a discussão para a aprovação da lei dos orgânicos envolve diversos setores interessados. Crescendo em importância a agroecologia pode apoiar-se cada vez mais em novas técnicas e insumos que podem ser utilizados com baixo impacto ao ambiente. Ao contrário do que muitos acreditam e pregam para produzir de forma orgânica o conhecimento deve ser muito mais aprimorado que para a produção convencional. No atual contexto que se estabelece para produção agrícola através do emprego de agroquímicos a

prática agrícola agroecológica torna-se um desafio para técnicos que possuem uma formação tipicamente voltada à agricultura convencional (SEGHESE, 2006).

Entremeada a filosofia agroecológica e as outras filosofias das novas correntes agrícolas encontra-se, como tema principal de todas, a sustentabilidade. Segundo Bergamin Filho (2007) a sustentabilidade engloba-se em um contexto sistêmico, no qual sistemas se mantêm produtivos por períodos longos de tempo com custos econômicos e ambientais socialmente estáveis.

Nos agroecossistemas é o produtor que causa o maior impacto sobre o ambiente de desenvolvimento das plantas, alterando e ajustando o ambiente físico e biológico as necessidades da cultura (GLIESSMAN, 2001).

De forma semelhante ao que ocorre na agricultura convencional a tecnologia deve ser empregada à agricultura orgânica. Novas ferramentas que possam auxiliar no cultivo agroecológico são necessárias, mesmo considerando-se que pesquisas nessa área são ainda incipientes.

Objetivando reduzir o impacto dos efeitos promovidos pelos pesticidas e aumentando a produção de alimentos que apresentem melhor qualidade, visando uma agricultura sustentável, buscam-se novas formas de proteção de plantas, sendo uma delas o emprego de extratos e óleos essenciais. Trabalhos empregando estas formas alternativas de controle de doenças e mesmo de pragas estão cada vez mais presentes dentro da prática agroecológica (STANGARLIN, 2007).

2. 2. Interação Patógeno – Hospedeiro

2.2.1. As defesas das plantas

Pela teoria evolucionista de Darwin, as plantas em sua evolução desenvolveram mecanismos diferentes de defesa contra agentes externos, competindo por luz e nutrientes, estando presentes nos mais diferentes ecossistemas (HARBORNE, 1993). Estes mecanismos de defesa podem ser originários de mutações herdadas, seleção natural e mudanças evolutivas (TAIZ & ZEIGER, 2003).

A condição de suscetibilidade a doenças surge com importância nas plantas cultivadas, por reduzirem a produtividade e das culturas. Em comunidades naturais, as plantas possuem resistência natural ou apresentam-se em relação simbiótica com os parasitas não promovendo estes danos consideráveis (HARBORNE, 1993).

Os mecanismos de defesa da planta compreendem aqueles relacionados aos caracteres físicos e morfológicos e outros relativos às defesas químicas, as quais vêm sendo amplamente estudadas nas últimas décadas (MARASCHIN-SILVA, 2004).

A primeira defesa da planta em relação ao ataque dos patógenos é a superfície, na qual o patógeno irá fixar-se. Algumas das barreiras físicas inerentes nesta defesa inicial incluem: a cutícula; os estômatos e lenticelas; células epidérmicas diferenciadas (AGRIOS, 2005). Tais estruturas presentes na planta possibilitam barreiras que dificultam ou impedem a colonização de tecidos pelo patógeno.

Quanto às defesas bioquímicas, estas podem ser representadas pela ação de vários compostos chamados de metabólitos secundários, tais como fenóis, quininas, lactonas, glicosídeos, terpenos, saponinas e taninos (SILVA et al., 2006).

Os metabólitos secundários compreendem substâncias com funções ecológicas importantes aos vegetais. Estas substâncias atuam na resposta a estímulos ambientais e nas interações com outras plantas e animais e não apresentam ação direta conhecida em processos como fotossíntese, transporte de solutos e translocação (TAIZ & ZEIGER, 2006). Quando apresentam atividade biológica são chamados princípios ativos (PINTO & BERTOLUCCI, 2002). A distribuição restrita de determinados compostos como estes, pode servir como marcadores taxonômicos de algumas famílias (BENNET & WALLSGROVE, 1997).

2.2.2. Características anatômicas e sua influência na infecção por patógenos

Análises anatômicas do desenvolvimento do patógeno na planta (considerando que as características estruturais são a primeira forma de defesa da planta) podem auxiliar no entendimento dos processos da interação entre patógeno-hospedeiro (SOUZA, 2008), levando ao desenvolvimento de formas de controle mais eficientes.

Alguns dos mecanismos pelos quais as plantas defendem-se de agentes patogênicos são constitutivos, outros podem ser ativados quando do contato desses agentes (STICHER *et al.*, 1997).

Características anatômicas como a presença de cutícula, número e quantidade de estômatos e a pilosidade podem facilitar ou dificultar o processo de infecção pelo patógeno. Grande quantidade de pilosidade e a cerosidade da cutícula dificultam o acúmulo de água sobre a folha, interferindo na germinação de esporos de patógenos que necessitam de alta umidade para ativar este processo (MEDEIROS, 2003).

Paredes mais espessas, que apresentam alguma lignificação, podem auxiliar na resistência à ação de enzimas degradadoras e à difusão de toxinas liberadas pelos patógenos. Assim, regiões lignificadas como as fibras esclerenquimáticas e os vasos xilemáticos presentes nas nervuras, podem inibir o desenvolvimento fúngico nestas áreas (PASCHOLATI & LEITE, 1995; AGRIOS, 2005).

Em estudos com seringueira (*Hevea brasiliensis* (Wild ex Adr. Juss.) Mull. Arg.), Santos *et al.* (1999) observaram a influência da superfície foliar e de elementos como a cutícula na infecção de *Phytophthora capsici*.

Sticher *et al.* (1997) referem-se a trabalhos nos quais a lignificação e formação de papilas e halos, atuam como mecanismos de defesa contra a infecção de patógenos. Tais estruturas anatômicas presentes nas folhas são formadas após a indução promovida pelo contato com o agente patogênico.

Estudos anatômicos em ramos de laranja-doce realizados por Marques *et al.* (2007) auxiliaram na compreensão dos processos de infecção pelo vírus causador da leprose dos citros. Neste caso foi observado que determinadas características anatômicas são capazes de explicar porque o vírus torna-se não-sistêmico, no caso de infecção pelo vírus do tipo citoplasmático.

2.2.3. Influência de patógenos na taxa fotossintética da planta

A maioria dos patógenos que se manifestam formando estruturas infecciosas na superfície das folhas promove sintomas que reduzem a área verde, promovendo

decréscimo da superfície disponível para a realização de trocas gasosas (ROBERT et al., 2005).

Há relatos de várias doenças reduzindo a taxa fotossintética em diversas espécies, sendo que em alguns casos há estímulo durante os primeiros estádios da infecção e decréscimo em estádios mais avançados da doença, contudo, sem muitas explicações (ELLIS et al., 1981).

Machado et al. (2006) avaliando a fotossíntese em plantas afetadas pela Clorose Variegada dos Citros (CVC), observaram queda nos valores de assimilação de CO₂, transpiração e fluxo de seiva, em decorrência da queda dos valores de condutância estomática, relacionando tais fatos a obstrução de vasos xilêmicas promovida pelo patógeno.

Godoy et al. (2001) demonstraram a redução de até 40% na taxa líquida de fotossíntese em milho afetado por *Phaeosphaeria maydis*, agente causal da mancha foliar de Phaeosperia.

Em macieira, Ellis et al. (1981) trabalhando com míldio, causado por *Podosphaera leucotricha*, observaram a redução das taxas de fotossíntese e transpiração, sendo que estas taxas estão intimamente ligadas com a redução do conteúdo de carboidratos em folhas severamente afetadas.

2.3. Cultivo de plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais pelo homem acompanha sua própria história. Desde a antiguidade já existem relatos do emprego de plantas com efeito curativo o que se prosseguiu pelos séculos. Inicialmente o homem era guiado pelo instinto, e posteriormente, associava a cura a práticas místicas e mágicas, conhecendo, com o avanço tecnológico, as propriedades terapêuticas das plantas (CORRÊA JUNIOR et al., 1994).

Plantas medicinais podem ser consideradas como plantas das quais os extratos ou compostos químicos isolados são empregados na fabricação de drogas. Estas plantas estão intimamente relacionadas às plantas condimentares, estimulantes e também aquelas produtoras de óleos essenciais. Tais espécies estão entre as primeiras plantas utilizadas pelo homem (GUPTA, 1991).

Um grande número de espécies vegetais pode ser encontrado nas regiões equatoriais da América do Sul, África e Ásia. Dentre esta biodiversidade, muitos são os produtos que podem ser empregados pela importância econômica. Enquadram-se nestes produtos, com grande destaque, os fitoterápicos (GUERRA & NODARI, 2004).

O mercado mundial de espécies aromáticas tende a um grande aumento incentivado pela demanda por sabores étnicos e exóticos para as comidas. Grandes importadores destas espécies são os Estados Unidos, Alemanha e Japão (PETER, 2001).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo em uma grande extensão territorial, tal fato relacionado ao grande número de condições ambientais diferenciadas que ocorrem pelo país. A flora mostra-se de grande importância para a população brasileira, que em maior ou menor extensão utilizam-se destas plantas. Considerando-se a baixa renda da população e as deficiências apresentadas pelo sistema de saúde, as plantas medicinais adquirem uma grande importância para a medicina tradicional, ligada a sabedoria popular (SCHEFFER et al., 2002)

Quanto ao mercado nacional estima-se que envolva valores de 700 a 800 milhões, levando ao interesse cada vez maior de produtores rurais na produção de plantas medicinais, condimentares e aromáticas (CORRÊA JR. et al, 2006).

Essas plantas são amplamente empregadas por possuírem determinados princípios ativos que atuam como formas curativas ou mesmo preventivas de determinadas enfermidades em seres humanos, animais e mesmo em plantas cultivadas (CORRÊA JR. et al, 2006; BOFF et al., 2008). Tais princípios ativos pertencentes à classe de metabólitos secundários (PINTO & BERTOLUCCI, 2002).

A crescente demanda por plantas medicinais tem aumentado seu cultivo e/ou extrativismo, sendo estes cultivos alternativa, cada vez mais importante, para a agricultura brasileira (CORRÊA JUNIOR et al., 1994). Apesar de o cultivo ser uma das etapas mais importantes para obtenção do produto final, este segmento ainda carece de pesquisas.

A produção comercial de plantas medicinais está relacionada na maioria das vezes, com o fornecimento de matéria prima para a indústria farmacêutica. Assim, o controle de qualidade é um fator de grande importância. Relacionado a tal fato, o fornecimento continuado é outro aspecto importante para o setor (SCHEFFER & CORREA

JR., 2004). Com o aumento da demanda do mercado de plantas medicinais a qualidade dessas plantas vem sendo afetada negativamente (REIS, 2004).

Neste contexto, para o fornecimento contínuo e de qualidade para a indústria novas tecnologias são demandadas para que os processos de cultivo possam ser melhorados. As plantas apresentam-se como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, sendo que muitos destes são modelos para a síntese de muitos fármacos (MARTINS et al., 2003).

O Ministério da Saúde recentemente com o incentivo a produção de plantas medicinais e fitoterápicos sugere este tipo de produção como estratégico para áreas de menor dinamismo econômico. Assim, necessita-se ainda uma estruturação de cadeias e arranjos produtivos, voltados à exploração agrícola e comercial (BRASIL, 2006).

Para Sartório et al. (2000), o cultivo orgânico de plantas medicinais torna-se mais adequado, pois favorece um maior equilíbrio entre a produção e o meio ambiente, evitando contaminações com agroquímicos que poderiam alterar a composição de princípios ativos, garantindo, assim, produtos de qualidade.

Em 2000, estima-se que o mercado de plantas medicinais tenha envolvido em torno de 19,5 bilhões de dólares, esperando um crescimento para os Estados Unidos de cerca de 5 vezes, para a América Latina de 3 vezes e para a Europa de 2 vezes (CORRÊA JUNIOR et al., 2006).

O mercado para plantas medicinais produzidas em cultivo orgânico ainda é restrito a algumas espécies e exigido apenas por alguns países importadores. Contudo, devido a demanda crescente por produtos alimentícios orgânicos relacionada à segurança alimentar, espera-se que o cultivo orgânico de plantas medicinais cresça em importância no cenário internacional (GEORGE, 2001).

A concentração dos princípios ativos depende ainda do controle genético da espécie que está sendo cultivada, aliado à resposta aos estímulos do meio representado pelo excesso ou deficiência de algum fator de produção (MARTINS et al., 2000). Neste sentido, fatores ecofisiológicos, físicos e relacionados ao ambiente, podem modificar radicalmente as características químicas e morfológicas de plantas medicinais (VANHAELEN et al., 1991).

O uso de produtos químicos para o controle de doenças em cultivos de plantas medicinais, como fungicidas comerciais, é inadequado. Tal fato justifica-se pela ausência de produtos registrados para as espécies produzidas e pelas alterações que estes produtos podem ocasionar quanto aos princípios ativos (PINTO & BERTOLUCCI, 2002). O processo de secagem e extração pode concentrar os agroquímicos empregados no cultivo (CORRÊA JR. et al, 2006). Além disso, há escassez de informações quanto à segurança da utilização de matérias primas produzidas com o emprego de produtos químicos.

No Brasil são poucos os levantamentos de patógenos de plantas medicinais. Urben et al. (1987) no Distrito Federal realizou um trabalho de identificação de patógenos presentes em 52 espécies de plantas medicinais. Dos resultados obtidos o gênero *Puccinia* apresentou como um dos gêneros com o maior número de registros. Lima (2002) em trabalho com 27 espécies de plantas medicinais, em Lavras – MG identificou e descreveu 30 anomalias provocadas por fungos. Mais escassos ainda são os estudos com controle de doenças em cultivos de plantas medicinais. Residem como aspectos mais importantes no desenvolvimento de tecnologias agrônomicas características de adaptação das plantas, adubação, densidade de plantio e época de colheita, por exemplo.

Plantas medicinais são espécies recém-domesticadas pelo homem com restrita seleção dirigida para rendimento físico e químico. Com isso conservam ainda grande diversidade genética e certa rusticidade natural (RIBEIRO & DINIZ, 2008).

Estas plantas são, geralmente, empregadas como insumos no controle de doenças de plantas (STANGARLIN, 2007), sendo que os problemas fitossanitários pontuais que ocorrem em seus cultivos acabam sendo ignorados. Alguns destes problemas tornam-se preocupantes apenas quando surgem danos consideráveis para a produção, como é o caso da ferrugem do capim-limão no Estado do Paraná (VIDA et al, 2006).

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas de manejo adequado de doenças torna-se uma ótima ferramenta para a obtenção de matérias primas de melhor qualidade, podendo resolver problemas apresentados em áreas de cultivo. Assim, o emprego de formas de controle alternativo de pragas e doenças é cada vez mais enfocado dentro do cultivo orgânico (BOFF, 2008).

2.4. Agentes de controle alternativo de doenças em plantas

São vários os agentes de controle que passaram a ser empregados para o controle de doenças, tanto com ação direta sobre os microorganismos quanto como indutores de resistência. Tais agentes podem ser extratos, hidrolatos e óleos essenciais de plantas medicinais (STANGARLIN, 2007), caldas, preparados homeopáticos, biofertilizantes (BOFF, 2008).

Agentes de controle para as doenças irão atuar de forma diferenciada nas plantas. Produtos indicados como protetores previnem a germinação e penetração de esporos, produtos de contato agem diretamente sobre o patógeno; ambos atuarão na superfície dos órgãos vegetais. Alguns produtos considerados sistêmicos serão translocados pela planta atuando em sítios específicos do patógeno (ZAMBOLIM et al., 2008). Além da ação fungitóxica direta, alguns produtos podem atuar como indutores de resistência, os chamados agentes elicitores (MORAES, 1992).

Os agentes elicitores são compostos que incluem substâncias como enzimas, peptídeos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas e componentes de parede (KEEN et al., 1983; HAHN, 1996). Esses elicitores podem ser de origem biótica, microbiana (elicitador exógeno) ou da própria planta (elicitador endógeno), e de origem abiótica, como luz UV ou metais pesados, agentes que promovem algum tipo de estresse nas plantas (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Um dos objetivos do estudo de elicitores é a descoberta de moléculas que induzam a resistência sistêmica, entre outros mecanismos, através da produção de fitoalexinas (SOBRINHO et al., 2005).

Estudos recentes evidenciam que os indutores de resistência podem atuar diretamente na síntese de fitoalexinas que constituem compostos antimicrobianos, de baixo peso molecular, (HAMMERSCHMIDT, 1999), resultantes de metabolismo secundário, acumulados a partir da resposta de plantas a estresse ocasionado por fatores biológicos, físicos ou químicos, que podem reduzir ou suprimir a atividade do agente patogênico (PURKAYASTHA, 1995).

Vários produtos vêm sendo testados para diferentes culturas com a finalidade de induzirem algum tipo de defesa da planta. Dentre aqueles originados de plantas

medicinais e cogumelos, pode-se citar o eucalipto utilizado por Bonaldo et al. (2004), que demonstrou resultados positivos como indutor de resistência a *Colletotrichum lagenarium* em pepino. Silva et al. (2007) empregaram extratos de cogumelos como indutores de resistência contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.

O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, compostos por misturas de substâncias orgânicas imiscíveis em água, extraídos de plantas por processos específicos, sendo o mais simples por arraste de vapor d'água (CRAVEIRO, 1981).

Apresentam-se como substâncias com constituintes complexos e variáveis, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre, dentre os quais destacam-se aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos e sesquiterpenos. Possuem características peculiares odoríferas, lipofílicas, líquidas, e voláteis, conhecidos também como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, apresentam-se em diferentes concentrações, ocorrendo sempre um composto majoritário, e outros em menores quantidades (SIMÕES & SPITZER, 2000). Podem ser encontrados em células especiais das plantas como glândulas, tricomas glandulares, ductos de óleo e resina, situados em qualquer parte da planta (PENGELLY, 2004).

Tais óleos são raramente encontrados em gimnospermas (com exceção para as coníferas) e em angiospermas monocotiledôneas (com exceção de gramíneas - especialmente espécies de *Cymbopogon* e *Vetiveria*) e zingiberáceas (espécies de *Alpinia* e *Curcuma*). Em dicotiledôneas os óleos essenciais são abundantes, principalmente em famílias como Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae (SIMÕES & SPITZER, 2000).

De uma forma geral os terpenóides e os fenilpropanóides são os principais componentes dos óleos essenciais. Os terpenos são classificados segundo as unidades de isopreno (C_5H_8) que os constituem, sendo assim os terpenóides presentes em óleos essenciais enquadram-se como mono e sesquiterpenos (HARBORNE et al., 1999). Os fenilpropanóides são compostos orgânicos de um anel benzênico ligado com três átomos de carbono (PENGELLY, 2004).

As funções biológicas dos óleos essenciais para os vegetais são complexas, podendo atuar na polinização, proteção contra agentes externos, além de participarem de processos celulares (PINTO & BERTOLUCCI, 2002). A composição pode variar de acordo com a estação, hora do dia, condições de crescimento (solo, adubação, práticas culturais) e carga genética (PENGELLY, 2004).

ABREU (2006) testando óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Syzygium aromaticum* (cravo), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) e *Mentha piperita* (hortelã) comprovou o efeito destes agentes no controle de *Alternaria solani*, tanto em condições *in vitro* como em condições de campo, sendo que a doença promovida por este fungo, a pinta-preta do tomateiro, enquadra-se como um dos piores problemas fitossanitários na cultura do tomate.

Considerada um dos piores problemas fitossanitários da cultura da soja, a ferrugem asiática, provocada por *Phakopsora pachyrizi*, pode ser controlada em condições “*in vitro*” e em casa-de-vegetação com óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (citronela), *Azadirachta indica* (nim) e *Thymus vulgaris* (tomilho) (MÉDICE et al., 2007).

Wilson et al. (1997) testaram contra *Botrytis cinerea* a ação antifúngica de 345 extratos de plantas e 49 óleos essenciais. De todos os óleos testados os de palma-rosa (*Cymbopogon martini*), tomilho (*Thymus zygis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) apresentaram melhores resultados na inibição do fungo.

Fiori et al. (2000) utilizando extratos vegetais e óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *Achillea millefolium* observaram a inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos de *Didymella brioniae*, agente causal da podridão gomosa em Cucurbitaceae.

Na composição do óleo essencial de mil folhas *Achillea millefolium* são encontrados terpenos como o cineol, borneol, pinenos, cânfora e azuleno (LORENZI & MATOS, 2008). Além destes compostos, são relatados para a planta flavonóides (luteolina e apigenina), derivados terpênicos e sesquiterpênicos, taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, esteróides, ácidos graxos, alcalóides e princípio amargo (SOUZA et al., 2005).

A citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.) apresenta óleo essencial rico em citronelal (cerca de 40%), além de pequenas quantidades de geraniol, citronelol e ésteres. O citronelol é excelente aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação anti-microbiana local e acaricida (MARCO et al.,2007).

A palma-rosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) J. F. Watson) apresenta aproveitamento de seu óleo para a perfumaria visto que se assemelha ao odor de rosas. Em sua composição o componente de maior expressão é o geraniol (75 a 95%), citral, aldeído fórmico, aldeído isovalérico, dipenteno, β – ocimeno, metil heptenona, D – linalool, L – α tepinol, farnesol (OLIVEIRA & AKISUE, 2003).

A menta (*Mentha piperita* L.) apresenta um dos óleos essenciais mais conhecidos, do qual é extraído o mentol empregado em medicamentos, cosméticos e alimentos. Cita-se em sua composição o mentol, mentona, ésteres metílicos, terpenos, cineol, tantino e princípio amargo (OLIVEIRA & AKISUE, 2003). Originária da Europa e trazida na época da colonização do Brasil é amplamente cultivada em jardins e quintais. Em relatos etnobotânicos é empregada como antibacteriana, antifúngica e anti-helmíntica (LORENZI & MATTOS, 2008). O mentol é um dos principais constituintes do óleo essencial, correspondendo a cerca de 40% do total de óleo essencial, sendo o componente responsável pelas características aromatizantes e sensação de refrescância. Os isômeros do mentol são encontrados como ésteres acetato (DAVID, 2007).

Syzigium aromaticum L., originário da Índia, conhecido popularmente como cravo, apresenta como um dos principais componentes de seu óleo essencial o eugenol. Ranashinge et al (2002) testando este óleo comprovaram sua ação antifúngica contra fungos de pós- colheita isolados de banana, sendo estes *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichium musae* e *Fusarium proliferatum*. Pereira et al (2008) testando o óleo essencial de cravo e de outras plantas medicinais, entre elas o capim-limão, observaram o efeito inibitório destes sobre duas bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, causadoras de contaminações em alimentos, podendo estes óleos serem empregados como formas de controle microbiológico em alimentos.

Um dos óleos mais conhecidos e utilizados é o óleo de eucalipto. Esse apresenta em sua composição principalmente o cineol. Lee et al. (2008) testando diversas espécies de Myrtaceae, entre elas *Corymbia citriodora*, demonstraram o efeito fungitóxico do

óleo essencial de algumas destas espécies sobre o oomycete *Phytophthora cactorum* e os fungos *Cryphonectria parasitica* e *Fusarium circinatum*.

Pinto et al. (2008) demonstraram o efeito in vitro de extratos de folhas de eucalipto na inibição da germinação de *Sclerotium cepivorum*.

O extrato pirolenhoso é uma mistura obtida através da condensação da fumaça produzida durante o processo de carbonização da madeira. Constitui-se de 800 a 900 cm³ dm⁻³ de água, e uma série de componentes químicos, predominando, quantitativamente, o ácido acético, o metanol, a acetona e os fenóis (ZANETTI et al., 2004). É empregado em diversas culturas como arroz, batata-doce e melão, e com finalidades diferentes como fertilizante orgânico, nematicida e fungicida (ZANETTI et al., 2003).

2.5. A espécie *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

O capim limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) é uma gramínea perene, de origem asiática (Índia), conhecida popularmente como capim – cidró, capim – limão, capim – cidreira, capim – cidrão, citronela de Java (CASTRO & CHEMALE, 1995), capim-santo, capim de beira de estrada, erva cidreira (MARTINS et al., 2000), capim-cheiroso, capim-catinga (CORREA JR. et al., 1994). Apresenta odor aromático agradável característico de limão, sabor aromático e ardente e coloração verde-pálida (GOMES & NEGRELLE, 2003).

C. citratus (DC.) Stapf pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae. O gênero *Cymbopogon* apresenta cerca de 30 espécies aromáticas, sendo a maioria de distribuição tropical (GOMES & NEGRELLE, 2003). Conhecidas popularmente como capim-limão encontram-se duas espécies *C. citratus* (DC.) Stapf e *C. flexuosus* (Nees ex Steud) Wats, contudo a mais difundida no Brasil é a primeira.

Dentre as espécies do gênero *Cymbopogon* outras que despertam interesse são *C. pendulus* (Nees ex Steud) Wats, adaptada a regiões frias e cultivada no Norte da Índia (SKARIA et al., 2006), *C. densiflorus* (Steud.) Stapf originário da África (BARBOSA, 2007), *C. winterianum* Jowitt. popularmente conhecido como citronella, usado

como repelente de insetos, *C. martinii* (Roxb.) Wats conhecido como palma-rosa e apresentando como principal constituinte do óleo o geraniol (MALLAVARAPU et al., 1998).

Caracteriza-se como uma erva perene, de hábito cespitoso, forma touceiras compactas com rizoma semi-subterrâneo (MARTINS et al., 2000). As flores são de dois tipos, sendo a inferior rudimentar e a superior hermafrodita nas espiguetas sésseis, geralmente masculinas nas pediceladas (CASTRO & CHEMALE, 1995). São raramente observadas no Brasil (LORENZI & MATOS, 2008).

As plantas apresentam folhas alternas, sendo estas constituídas por bainha convoluta e limbo. Bainha alargada em direção à base, de 4,0 cm a 26,0 cm de comprimento, com 0,6 cm a 6,5 cm de largura na região basal, 1,0 cm a 3,5 cm na região mediana e 0,9 cm a 2,1 cm na região apical, as mais externas, mais rígidas na porção basal. Lígula com 0,2 cm de altura, curta e truncada, membranosa, de coloração castanha na folha adulta e verde claro na folha jovem (FARMACOPÉIA, 2003).

Amplamente distribuída por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, é empregado pela medicina popular como calmante, espasmolítico e antimicrobiano. Sendo consumido na forma de infuso do norte ao sul do país (LORENZI E MATOS, 2008). Matos (1994) relata ação calmante e espasmolítica para o citral e analgésica para o mirceno.

Provavelmente foi introduzida no Brasil na época colonial, estando difundida por vários estados e cultivada com finalidades aromáticas e ornamentais (PIO CORREA, 1984). Há relatos da introdução da espécie pelos ingleses no início do século XX, para contenção de erosão, nas margens de ferrovias (CZEPAK, 2000).

Gomes & Negrelle (2003) relatam o emprego da espécie em vários países como a China, Índia, Indonésia e Nigéria, com finalidades diversas, dentre as principais, é empregada para problemas estomacais. No Brasil, há relato em vários Estados da Federação, como Ceará, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Brasília e Paraná, também com finalidades diversas específicas de cada localidade.

Além da utilização pela cultura popular, o óleo essencial da planta é usado industrialmente pelo segmento alimentício, cosmético, de perfumaria e na fabricação de inseticidas (NEGRELLE & GOMES, 2007). Há relatos do emprego da gramínea como forrageira para bovinos e elefantes em algumas regiões da Índia e para a cobertura de cabanas

(PIO CORREA, 1984). É encontrada ainda em terraços, para contenção de erosão (MARTINS et al., 2000).

A origem geográfica pode determinar algumas diferenças quanto a composição, contudo o principal constituinte do óleo essencial, independente da origem da matéria-prima é o citral (NEGRELLE E GOMES, 2007). Além do citral outros componentes são o geraniol, mirceno, cimbopogonol, limoneno e dipenteno (MARTINS et al., 2000). Para a espécie é relatado de 75 – 80% de citral no óleo essencial (SKARIA et al., 2006).

O citral é um monoterpeno resultante de uma mistura dos isômeros *trans*, citral A, denominado geranial ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) e o *cis*, citral B, denominado neral ((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 01) (MATOS, 2000). Apresenta atividade antisséptica, cinco vezes mais forte que no fenol. É empregado como flavorizante em alimentos e perfumaria (HARBORNE et al., 1999). Pode ser usado ainda na obtenção de vitamina A, ionona e beta caroteno (MARTINS et al., 2003).

No mundo, a produção de óleo de capim-limão é de cerca de 1000 t em uma área de aproximadamente 16000 ha. A produção comercial desta gramínea é notável na Índia, sendo este país o principal produtor e exportador de óleo, principalmente no Estado de Kerala (SKARIA et al., 2006). Naquele país há cultivares desenvolvidos especialmente para o cultivo, diferentemente do que ocorre no Brasil, em que as mudas são obtidas de beiras de estrada ou de cultivos caseiros como citam Negrelle & Gomes (2007).

No Brasil, a produção comercial é relatada, com grande importância nos Estados do Sul e Sudeste, notadamente no Estado do Paraná, considerado o maior produtor de plantas medicinais no país, onde a produção distribui-se por vinte e um municípios produtores (GOMES et al., 2007).

Apesar de ser considerada perene, para o cultivo, recomenda-se a renovação a cada 4 a 5 anos (CORREA JR. et al., 2006). Desenvolve-se bem em solos areno-argilosos, é exigente em matéria orgânica e não tolera locais sombreados (CASTRO & CHEMALE, 1995). Demonstra resistência a *Meloidogyne javanica* e tolerância a *Meloidogyne incognita* (SOUZA et al., 1995). Pode ser atacada por cochonilhas de raiz (CORREA JR. et al., 2006).

Para a máxima produção de óleo, a temperatura ótima é de 25-30°C e pluviosidade de 2500 -3000mm anuais, sendo que em lugares mais secos necessita-se de irrigação suplementar (SKARIA et al., 2006).

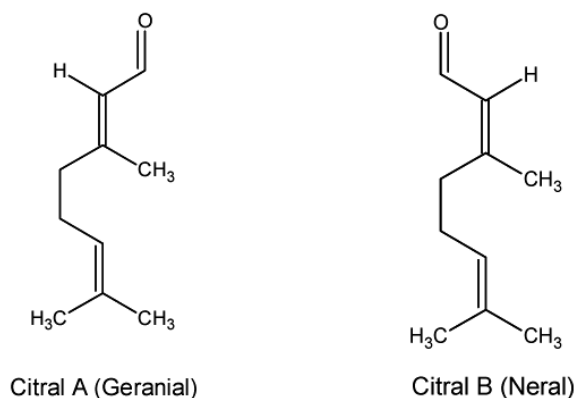


Figura 1. Estruturas químicas dos componentes do Citral

2.6. A ferrugem do capim-limão

O gênero *Puccinia* é classificado na família Pucciniaceae, ordem Uredinales, classe Teliomycetes e divisão Basidiomycota. A ordem Uredinales refere-se comumente às ferrugens, estimando-se que existam cerca de 5000 espécies divididas em aproximadamente 140 – 150 gêneros. Todas as espécies são parasitas obrigatórios causando sérios danos em diversas culturas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

As ferrugens encontram-se entre as doenças mais destrutivas, de grande importância para algumas culturas como no caso de gramíneas como o trigo. Ataca preferencialmente ramos e folhas, sendo a maioria de ocorrência local, algumas, sistêmicas. Dentre os principais gêneros causadores de doenças está o gênero *Puccinia* (AGRIOS, 2005).

Formas de controle para algumas culturas são variedades resistentes, aplicações de fungicidas e ainda retirada dos hospedeiros alternativos (AGRIOS, 2005).

González et al. (2008) trabalhando com avaliações agrônômicas, visando produção de óleo essencial de capim limão na Venezuela, observaram incidência de

100% de ferrugem causada por *Puccinia* sp., adaptando uma escala de notas para avaliar a severidade. Skaria et al. (2006) relatam a ferrugem como uma doença presente em cultivos da gramínea na Índia, sendo a aplicação quinzenal de fungicida uma medida indicada para o controle.

Como o capim-limão é uma espécie rústica e desenvolve-se bem em variadas condições, não eram relatados problemas com doenças (GOMES et al., 2007). Nos levantamentos de Urben et al. (1987) e Lima et al. (2002) não foi observada a presença de ferrugem em capim-limão, apesar de Lima et al. (2002) citar outra doença ocorrendo nesta planta.

O primeiro relato da ferrugem do capim-limão no Brasil foi feito recentemente por Vida et al. (2006) no Estado do Paraná, no entanto, foi diagnosticado o patógeno como sendo *Puccinia cymbopogonis* Mass. Em São Paulo, foi observada em 2007, no município de Araraquara, no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas a ocorrência de sintomas semelhantes aos relatados em plantas de capim-limão por SACRAMENTO (comunicação pessoal).

Quando identificado no Estado de São Paulo para a realização do presente trabalho acreditava-se que o patógeno era o mesmo, visto que as características apresentadas eram semelhantes, tanto em relação às características das lesões quanto às estruturas do fungo.

Com a identificação do patógeno *Puccinia nakanishikii* Dietel no Estado do Rio de Janeiro (MELO et al., 2008) amostras foram encaminhadas para identificação e constatou-se o patógeno causador da ferrugem do capim-limão, em São Paulo, como sendo o mesmo, *Puccinia nakanishikii* Dietel.

Puccinia nakanishikii Dietel foi relatado causando doença em plantações de capim-limão no Hawai e na Califórnia (GARDNER, 1985; KOIKE, 1999). No Brasil, o primeiro relato do patógeno foi feito recentemente no Rio de Janeiro (MELO et al., 2008).

A doença inicia-se com pequenas lesões foliares ferruginosas escuras, formando pústulas alongadas, concentradas na superfície da face abaxial da folha, apresentando grande quantidade de esporos marrom-escuros. A transmissão é rápida e feita

pelo vento, por mudas contaminadas, por instrumentos de corte e mesmo pelo contato manual entre plantas saudáveis e doentes.

Visando sistemas orgânicos de produção, ainda não há registros de formas de controle para a doença. Conceição et al. (2008) e Lorenzetti et al. (2008) relatam formas de controle alternativo “in vitro” para a doença, através da inibição da germinação de esporos do fungo com óleos essenciais e preparados homeopáticos.

Além destas duas espécies de ferrugem que acometem a gramínea, foi relatada *Puccinia purpurea* Cke., na Colômbia acometendo plantas de capim-limão e promovendo sintomas semelhantes (PARDO-CARDONA, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Campus de Botucatu: no Laboratório de Patologia de Plantas do Setor de Defesa Fitossanitária e, no Laboratório de Plantas Medicinais do Setor de Horticultura.

O experimento de campo foi realizado na Fazenda Experimental de São Manuel, a qual está situada a 22°44' de latitude S e 48°34' de longitude W e 740 m de altitude. O clima, segundo TUBELIS & SALIBE (1989) é classificado como Cfa. O solo, segundo CARVALHO et al. (1983), é caracterizado como Latossolo Vermelho Amarelo, de textura arenosa.

As características climáticas do período de realização do experimento em São Manuel – SP estão apresentadas na Figura 2. Os dados foram obtidos da Estação Climatológica de São Manuel, do Departamento de Recursos Naturais - Ciências Ambientais - FCA - UNESP/Lageado - Campus de Botucatu.

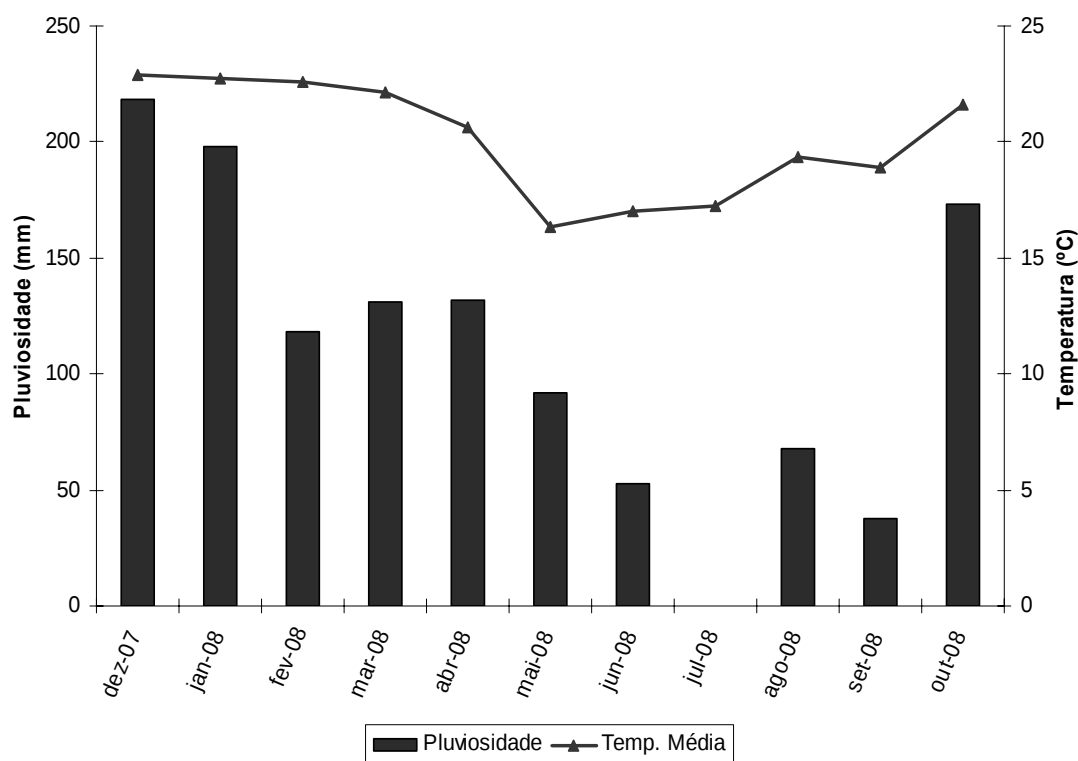


Figura 2. Pluviosidade e Temperaturas Médias na época de realização do experimento (dez-07 a out-08) – São Manuel - SP

3.1. Interação patógeno – hospedeiro

3.1.1. Identificação do Patógeno

Foram coletadas folhas de plantas de capim limão com sintomas da ferrugem provenientes de uma área de cultivo da Fazenda Experimental de São Manuel – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu – SP. As amostras foram herborizadas e enviadas para identificação no Centro de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, estando uma amostra depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), com o número de campo 179/08.

Para a identificação do fungo foram retiradas estruturas presentes nas folhas da planta e colocadas em lâmina para microscopia. Sobre essas estruturas foi aplicada

uma solução de lactofenol. Realizou-se observação em microscópio óptico e as principais estruturas foram fotografadas com auxílio de um sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio.

3.1.2. Anatomia foliar

O material botânico utilizado para o estudo anatômico de folhas infectadas constou de amostras de folhas que apresentavam sintomas da doença obtidas de plantas cultivadas na Fazenda Experimental de São Manuel – Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu – SP.

A sintomatologia foi observada segundo o seu desenvolvimento nas plantas. Desde o aparecimento das lesões até a formação das pústulas, fotografaram-se os sintomas com máquina digital.

Para a avaliação anatômica da infecção do patógeno nas plantas efetuaram-se cortes transversais realizados a mão, com auxílio de navalha de aço inoxidável em folhas infectadas da gramínea.

As secções foram clarificadas com a utilização de solução comercial de hipoclorito de sódio. Depois de clarificados, os cortes foram corados utilizando-se solução de azul de Toluidina 0,05% em pH 6,8, coloração dupla com azul de astra e safranina e com verde iodo e hematoxilina.

Os testes histoquímicos empregados constaram da aplicação de Sudan III, para a identificação de lipídios, Cloreto Férrico e Dicromato de Potássio, para a identificação de compostos fenólicos; Reagente de Bouchardt e Dragendorff, para a identificação de alcalóides.

Posteriormente alguns cortes foram fotografados com o auxílio de microscópio Leica acoplado a sistema de captura de imagens.

3.1.3. Medidas de Trocas Gasosas

Para as determinações de trocas gasosas em plantas de capim-limão infectadas pelo patógeno *P. nakanishikii* foi utilizado um sistema aberto portátil de

fotossíntese, com analisador de CO₂ por radiação infra-vermelha (“Infra Red Gas Analyser-IRGA”, Modelo Li-6400, LI-COR, USA).

Como padrão adotou-se a região mediana das folhas, completamente expandidas, totalmente expostas à radiação solar, sendo a face superior iluminada pela luz do sol (1200 - 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, sob condições de céu limpo). As plantas nas quais foram realizadas as medições pertenciam ao experimento da área de cultivo da Fazenda Experimental de São Manuel – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu – SP.

Foram realizadas duas avaliações da ferrugem, sendo à primeira no dia 11 de junho de 2008 e a segunda em 02 de julho de 2008. Foram considerados sete tratamentos referentes a seis notas obtidas de uma escala diagramática de severidade proposta por LORENZETTI et al. (2008b), estando baseada na avaliação de imagens digitais (figura3).

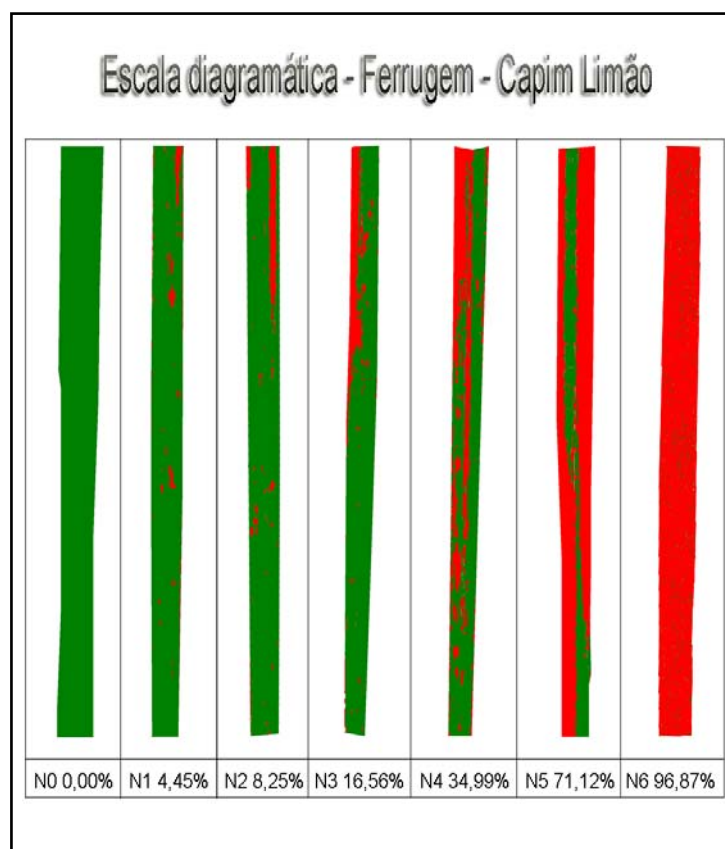


Figura 3. Escala diagramática utilizada para avaliação da severidade da doença

A presente escala foi obtida através de cópias digitais de 53 folhas afetadas pelo patógeno em diferentes severidades submetidas à determinação de área lesionada através de uma escala de RGB (red green blue), sendo os resultados obtidos em red e green. Com os resultados das cópias digitais através de uma curva logarítmica obteve-se a escala diagramática de sete níveis constando de seis notas. A curva logarítmica justifica-se pela lei de Weber-Fechner, que cita que a acuidade visual humana não é linear e sim logarítmica. Dessa forma a equação obtida para a descrição da escala diagramática foi: $y = 2,3929 e^{0,6461x}$.

Para cada tratamento foram realizadas quatro medições em um delineamento de blocos casualizados. Foram realizadas determinações da taxa de assimilação (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 na folha (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Estas determinações foram realizadas entre 9:00 e 10:00h para comparação entre os diferentes tratamentos.

Os dados obtidos para a assimilação líquida de CO_2 (A) segundo as diferentes notas de severidade foram ajustados para obtenção de uma equação seguindo o modelo $y = a - x^b$ para as duas avaliações, através do emprego da função PROC NONLIN do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

Dados de condutância estomática (g_s) e concentração interna de CO_2 (c_i) foram analisados segundo análise de variância e havendo significância dos resultados, os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

3.1.4. Óleo essencial em plantas afetadas por *P. nakanishikii*

De plantas da área experimental da Fazenda Experimental de São Manuel – Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus de Botucatu – SP foram coletadas folhas de plantas de capim-limão afetadas pela doença sendo selecionadas, com auxílio da escala diagramática, segundo cinco níveis de severidade da doença (%): N1 (0%), N2 (8%), N3 (16%), N4 (32%), N5 (64%).

As folhas foram secas a 40°C em estufa de circulação forçada de ar até obter-se massa constante. Foi pesada uma amostra de 35g de cada um dos cinco níveis de severidade. Após a determinação das massas, tais amostras passaram pelo processo de

hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. As amostras pesadas foram colocadas em balões (2000 mL) contendo 1000 mL de água. Após cerca de 90 minutos de destilação, quando não se observava mais aumento no volume de óleo na bureta, o óleo foi retirado em frascos de vidro previamente tarados através da separação feita pela diferença de densidade, sendo a água remanescente retirada com o auxílio de pipeta de Pasteur.

A determinação quantitativa (rendimento do óleo essencial) foi feita através da diferença do peso dos frascos e frascos + óleo essencial em balança analítica.

O delineamento experimental inteiramente casualizado constou de cinco tratamentos, representando os níveis de severidade com três repetições. Os dados foram transformados em % de óleo em 100g, posteriormente submetidos à análise de variância e havendo diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

3.2. Estabelecimento de estratégias de controle da doença

3.2.1. Testes *in vitro* para a inibição da germinação de esporos de *P. nakanishikii*

Esta etapa do experimento foi realizada no laboratório de Patologia de Plantas da Faculdade de Ciências Agronômicas – Campus de Botucatu.

Em ensaios prévios para a realização do presente experimento utilizando-se a técnica citada por MEDICE et al. (2007) e BONALDO et al. (2007) com a aplicação de óleos essenciais sobre o meio de cultura não propiciaram bons resultados. Assim, optou-se pela inclusão dos óleos e demais produtos ao meio de cultura.

Os testes em condições controladas foram realizados utilizando-se placas de petri de plástico estéreis, contendo 10 mL de meio de cultura agar-água e os agentes de controle. Foram utilizados os seguintes produtos como agentes de controle na inibição da germinação de esporos de *P. nakanishikii*:

- óleos essenciais de eucalipto (*Corymbia citriodora*), palma-rosa (*Cymbopogon martini*), cravo-da-índia (*Syzigium aromaticum*), menta (*Mentha* spp.), limão (*Citrus limonum*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e mil folhas (*Achillea millefolium*) nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04%;

- mentol cristalizado comercial solubilizado, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04% e
- extrato pirolenhoso de *C. citriodora*, nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 g/L.

Todos os óleos essenciais foram obtidos através do processo de hidrodestilação, com aparelho do tipo Clevenger. O mentol cristalizado e o extrato pirolenhoso foram obtidos em estabelecimentos comerciais.

Os óleos foram misturados ao agente surfatante, Tween 80, e incorporados ao meio agar-água fundente (cerca de 50°C) em vidros esterelizados que eram agitados. Após este procedimento o meio misturado aos óleos era colocado nas placas de petri, que permaneceram secando até a solidificação do meio de cultura em condições assépticas.

O mentol cristalizado foi solubilizado em etanol 96%, para que pudessem ser obtidas as concentrações empregadas no teste, estas soluções foram misturadas ao meio de cultura fundente em procedimento semelhante ao realizado para os óleos.

O extrato pirolenhoso foi misturado diretamente ao meio de cultura fundente da mesma forma dos demais tratamentos, sendo colocado nas placas de petri, permanecendo secando até a solidificação.

Como tratamento testemunha utilizou-se uma placa de petri contendo apenas o meio de cultura. Avaliou-se a influência do produto Tween 80 na germinação dos esporos em tratamentos contendo apenas este produto e o meio de cultura. Como efeito de comparação empregou-se um padrão químico considerado eficiente no combate de ferrugens, representado por um fungicida à base de mancozeb, incluído ao meio de cultura na dose recomendada na embalagem do produto.

Para a avaliação da germinação foi elaborada uma suspensão de esporos do patógeno. Estes esporos foram obtidos através de uma raspagem das pústulas presentes na face abaxial das folhas de plantas infectadas obtidas no campo, sendo os esporos transferidos para tubos tipo Eppendorf contendo água destilada estéril. Para a inoculação, foram utilizados 20µL da suspensão de esporos por repetição, colocadas sobre o meio de cultura para todos os tratamentos.

Após a inoculação, as placas permaneceram em temperatura de 23°C por 24 horas em câmara de germinação no escuro sendo então avaliadas. Aplicou-se uma

solução de lactofenol no intuito de paralisar o desenvolvimento dos esporos. Assim, realizou-se a contagem de 50 esporos com auxílio de microscópio óptico, na objetiva de 10x, para a avaliação da porcentagem de germinação em uma área escolhida ao acaso focada pela objetiva. Foram considerados germinados os esporos que apresentavam tubo germinativo de tamanho superior ao tamanho do esporo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando de quatro repetições por tratamento, sendo sete tratamentos com óleos essenciais, um tratamento com mentol, um tratamento com extrato pirolenhoso, um com fungicida, um com Tween 80 e uma testemunha. Para cada tratamento foram consideradas quatro concentrações para os óleos e o mentol e cinco concentrações para o extrato pirolenhoso.

Para análise estatística os tratamentos que apresentavam todos os valores das repetições iguais a zero foram excluídos, os demais tratamentos tiveram seus valores transformados para $\text{arc sen } \sqrt{}$ visando homogeneidade das variâncias. Estes dados após passarem por uma análise de variância foram submetidos ao teste de Dunnet a 5% de probabilidade através do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998). O teste de Dunnet foi escolhido por realizar comparações específicas entre a testemunha e os demais tratamentos (PIMENTEL-GOMES & GARCIA, 2002).

Considerando cada concentração para os diferentes tratamentos empregou-se a análise de variância e as médias, quando os resultados eram significativos foram comparados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998). Quando necessário os dados foram submetidos à transformação de $\text{arc sen } \sqrt{}$.

3.2.2. Testes em campo para o controle de *P. nakanishikii*

As mudas foram obtidas do Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Campus de Araraquara- SP, aclimatadas e repicadas em uma área da Fazenda Experimental de São Manuel nos meses de dezembro de 2007 até fevereiro de 2008.

Após o desenvolvimento das plantas foram retiradas mudas e padronizadas com 20 cm de altura. Após avaliação das características de fertilidade do solo,

não foi necessária a realização de calagem na área, que foi preparada em canteiros de 1,2m de largura. O espaçamento utilizado foi de 0,5 m entre plantas e 0,5 entre linhas. Tal espaçamento foi baseado nas recomendações de CASTRO & CHEMALE (1995), considerando assim uma população de plantas de aproximadamente 40.000 plantas/ha, espaçamento este utilizado também por produtores do Estado do Paraná (GOMES et al., 2007).

A adubação de plantio constou de esterco curtido na quantidade de 30 t/ha. A irrigação foi feita por aspersão segundo necessidade da cultura. O controle de plantas daninhas foi feito através de capina manual. Não houve problemas quanto a pragas. As mudas foram transplantadas em 27 de fevereiro de 2008 (Figura 4).

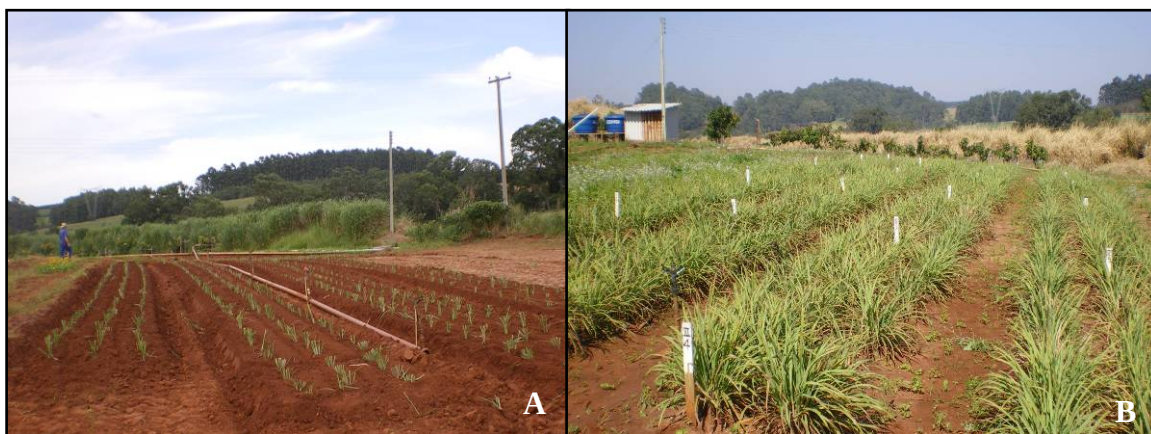


Figura 4. Vista geral do Experimento. A: no plantio em 27/02/2008 B: seis meses após o plantio em 22/08/2008.

As parcelas experimentais foram representadas por trinta plantas, dispostas em três linhas, considerando-se como parcela útil as cinco plantas centrais. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados com quatro repetições.

A partir dos ensaios “in vitro” escolheram-se dois óleos essenciais: citronela e eucalipto; o mentol e o extrato pirolenhoso. O critério para a escolha dos óleos essenciais foi a disponibilidade, facilidade e custo de obtenção destes produtos. Por representarem produtos diferenciados e apresentarem bons resultados optou-se pela utilização do mentol e do extrato pirolenhoso.

Como controle positivo, da mesma forma que nos testes “in vitro” empregou-se um fungicida, como padrão químico, a base de mancozeb, indicado para o

controle de fungos do gênero *Puccinia* e uma testemunha (controle negativo), com aplicação apenas de água.

Considerando-se a interação do ambiente nas condições de desenvolvimento em campo, empregaram-se inicialmente as concentrações de 0,1% para os óleos e para o mentol e 25g/L de extrato pirolenhoso. Na segunda etapa do experimento para os óleos essenciais utilizou-se a concentração de 0,075%, devido à apresentação de fitotoxidez com a concentração de 0,1%. O fungicida teve sua dose seguindo recomendações do fabricante.

Para a aplicação utilizou-se pulverizador manual com capacidade de 5L, visando reproduzir condições acessíveis a produtores rurais da espécie. Os tratamentos foram misturados ao adjuvante alquil-fenol-poliglicoléter (Extravon[®]) na dose de 30mL/100L. A quantidade de calda empregada foi de 750 mL para cada parcela.

Para a limpeza do pulverizador, entre a aplicação de dois tratamentos, foi utilizado etanol 96% e posteriormente água e detergente neutro. Para o fungicida foi utilizado outro pulverizador semelhante, que foi mantido durante todo o experimento apenas para esta finalidade, evitando-se contaminações. Foram realizadas aplicações semanais durante o período de quarenta e cinco dias.

Antes do início dos tratamentos foi realizada uma avaliação visual para que fosse constatada a severidade inicial da doença, sendo que a incidência era de 100% nas plantas de todas as parcelas. Para isso empregou-se a escala diagramática baseada em sete notas apresentada na Figura 3. Avaliações quinzenais foram feitas visualmente para que se observasse a severidade da doença.

Após 30 dias do início das aplicações dos produtos para o controle da doença foi realizada uma avaliação de duas folhas por planta útil, sendo consideradas a terceira e a quinta folha do perfilho central da planta. Estas folhas foram submetidas a uma cópia digital e a área lesionada quantificada com o auxílio de um programa computacional elaborado para esta finalidade. Após esta análise os valores médios foram avaliados quanto à variância e em existindo diferenças significativas os valores foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1998).

Foi realizada uma colheita das folhas visando à eliminação de folhas lesionadas, uniformização das plantas e avaliação da poda como forma de manejo da doença (Figura 5). Quinze dias após o corte os primeiros sintomas apareceram novamente, quando as plantas apresentavam cerca de 30cm de altura. Assim iniciaram-se as aplicações, que foram realizadas durante trinta dias, semanalmente. Após esse período foi realizada uma avaliação semelhante à realizada na primeira parte do experimento em campo.



Figura 5. Aspecto geral do experimento. A: após dez dias da colheita B: trinta dias após a colheita

Para obter-se uma estimativa de produção, quarenta e cinco dias após o primeiro corte foi realizado um segundo corte de três plantas centrais por parcela. Antes do corte avaliou-se a altura de cada uma das touceiras cortadas. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e, após a obtenção da massa da matéria fresca, foram mantidas em estufa com circulação de ar a 40 °C até massa constante, para posterior medida da massa de matéria seca.

Para avaliação quantitativa dos óleos, o procedimento foi semelhante ao realizado na primeira fase do experimento para a avaliação quantitativa do óleo em plantas infectadas (item 3.1.4.), apenas a amostra retirada foi de 100g.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação do patógeno

Após a análise das amostras de folhas infectadas com a ferrugem identificou-se o patógeno como sendo *Puccinia nkanishikii* Dietel.

O fungo apresenta paráfises amareladas capitadas ou clavadas nos soros urediniais. Os urediniósporos são abundantes de coloração castanha, variando as tonalidades e formato levemente ovalado, com ornamentação equinulada e poros germinativos equatoriais. Os teliósporos apresentam-se com pedicelos marrons, alongados de coloração castanha variando as tonalidades, os ápices apresentam paredes mais espessadas (Figura 6).

Em comparação com *P. cymbopogonis* o presente patógeno apresenta os urediniósporos mais ovalados e com padrões de ornamentação diferentes daqueles apresentados por Vida *et al.* (2006).

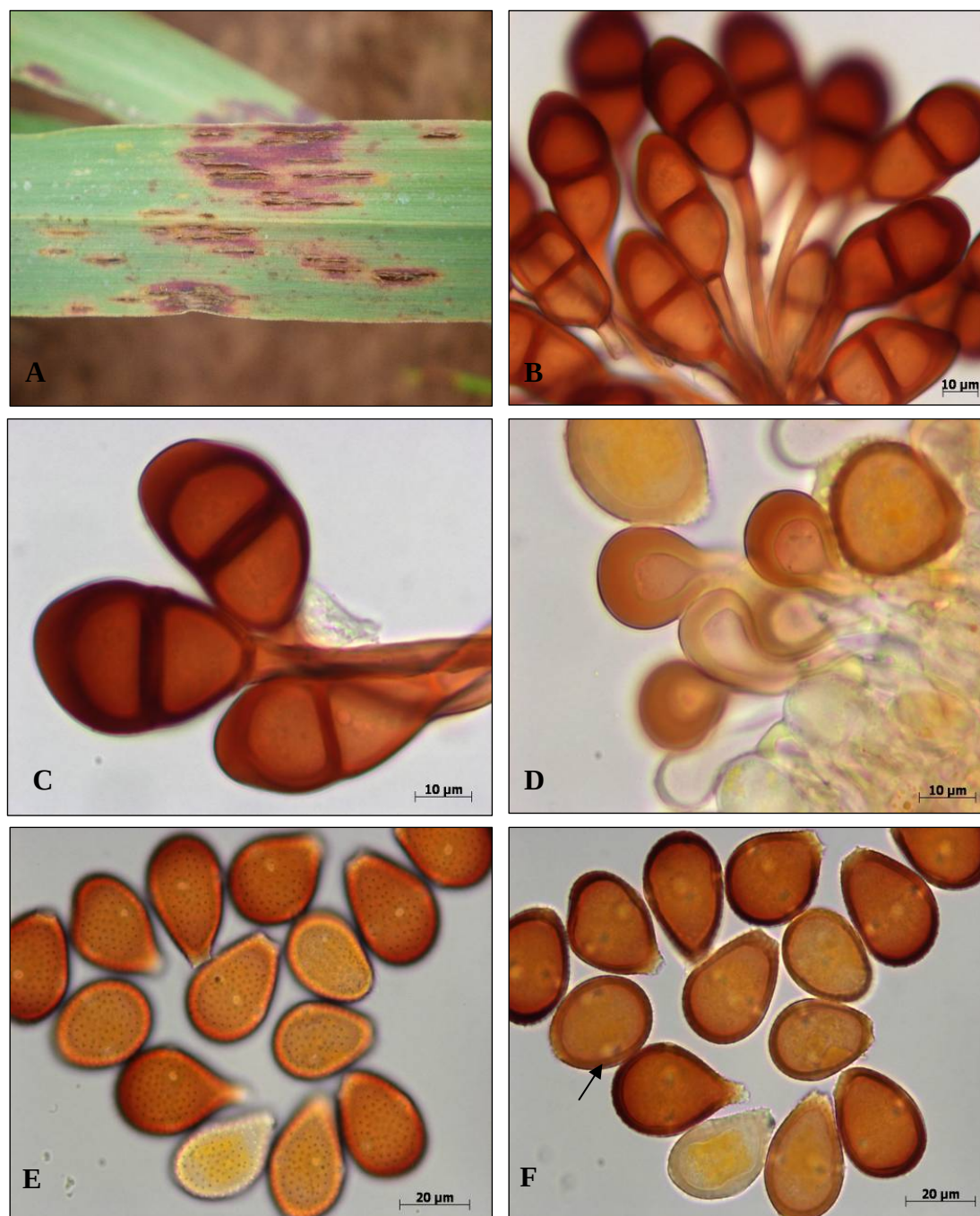


Figura 6. Sintomas e estruturas de *Puccinia nakanishikii* Dietel. A: sintomas da doença em folhas de capim-limão. B, C, D, E e F: Estruturas do patógeno em observação ao microscópio óptico. B e C: Teliósporos. D: paráfises. E: Ornamentação dos urediniósporos. F: em detalhe os poros germinativos – Centro de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, 2008.

4.2. Anatomia de folhas infectadas de capim-limão

A sintomatologia da doença apresentou-se inicialmente com pequenas manchas circulares amareladas nas folhas. Estas manchas evoluíram para estrias bronzeadas paralelas às nervuras. Na face adaxial, as manchas, inicialmente amarelas passaram a arroxeadas sendo que as regiões da margem das lesões apresentavam-se com coloração amarela.

Com o desenvolvimento da doença há formação das pústulas na epiderme da face abaxial das folhas de coloração marrom, com a liberação dos urediniósporos. Na epiderme da face adaxial nas manchas arroxeadas há formação de regiões necróticas no centro. Notou-se uma grande massa de esporos marrons.

As manchas cloróticas posteriormente evoluíram e houve coalescência das lesões. Em casos mais severos, ocorre acometimento de uma grande superfície do limbo foliar. Após a coalescência das lesões há um bronzeamento das áreas e posterior seca de todo o tecido em torno. Dificilmente foram observadas lesões sobre a nervura principal, sendo observadas nas áreas entre a nervura e o bordo foliar (Figura 7).

Quanto à descrição microscópica, não foi possível observar o início da germinação dos esporos do fungo nas folhas através de microscopia óptica.

Com a germinação dos esporos, segue o início do desenvolvimento das estruturas fúngicas, prosseguindo com o rompimento da cutícula, quando há formação das pústulas, e liberação de urediniósporos. Assim, as estruturas do patógeno podem ser observadas claramente sobre as células parenquimáticas da epiderme da face abaxial da folha, contudo, na maioria das regiões dos feixes vasculares, não houve desenvolvimento dessas estruturas, regiões estas que apresentaram estruturas lignificadas.

As estruturas anatômicas normais das folhas apresentaram-se semelhantes às representadas por Duarte & Zanetti (2004) e Martins et al. (2004). A epiderme é unisseriada, revestida por uma fina camada de cutícula lisa em ambas as faces da folha, sendo representada por células parenquimáticas intercaladas por pequenos agrupamentos de células esclerenquimáticas. A folha caracteriza-se como anfiestomática com estômatos em formato de halteres, característicos das gramíneas, distribuídos linearmente em faixas ao longo

das nervuras, sendo mais abundantes na epiderme da face abaxial, semelhante ao citado por Conforto & Andreoli (2003).

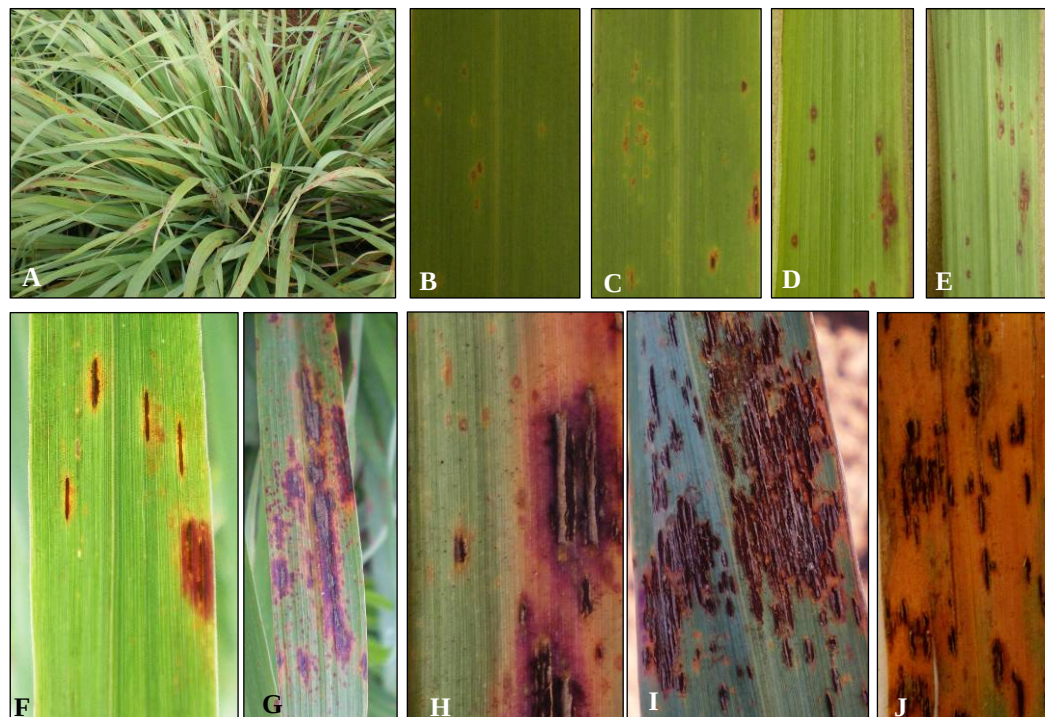


Figura 7. Imagens de indivíduo de capim-limão afetado por *Puccinia nakanishikii*. **A:** aspecto geral mostrando ataque severo do patógeno. **B:** pontuações cloróticas na epiderme da face adaxial. **C:** pontuações cloróticas e início da formação das pústulas na epiderme da face abaxial. **D:** lesões arroxeadas na epiderme da face adaxial. **E:** lesões arroxeadas na epiderme da face abaxial. **F:** estrias bronzeadas na epiderme da face abaxial. **G:** sintomas avançados na epiderme da face adaxial. **H:** estrias com liberação de uredosporos. **I:** Pústulas em estágio avançado. **J:** tecido em estágio avançado da doença. FCA/ UNESP/ Botucatu - SP

Apesar da existência da maior quantidade de esporos na face abaxial das folhas tal fato pode não estar diretamente relacionado à penetração de esporos do fungo, visto que, na maioria das ferrugens, a penetração do tubo germinativo dos esporos fúngicos é realizada diretamente, dispensando a existência de aberturas naturais ou ferimentos (FERREIRA, 1989).

A epiderme apresenta células parenquimáticas maiores, destacadas, as células buliformes. Estas células atuam sobre o enrolamento e o desenrolamento das folhas maduras, em função do estado hídrico de perda ou do ganho (ESAU, 1974). Ocorrem na

epiderme da face adaxial, são maiores que as demais e possuem parede celular fina e vacúolos grandes, geralmente encontradas em Poaceae (ALQUINI et al., 2000).

Para o mesofilo não há ocorrência de parênquima clorofiliano paliádico e lacunoso, assim organizados conforme descrevem para a espécie Oliveira & Akisue (1997), e sim a ocorrência de uma pequena camada de parênquima clorofiliano associado aos feixes vasculares caracterizada como anatomia Kranz característica de gramíneas, representada pelo arranjo radial de células do mesofilo ao redor dos feixes vasculares (ESAU, 1974).

Estes feixes vasculares são do tipo colateral fechado, sendo que os de maior calibre apresentam reforços internos e externos de fibras esclerenquimáticas. Os feixes menores são circundados por células parenquimáticas. Estes feixes distribuem-se paralelamente a nervura principal da folha.

As características anatômicas das folhas de capim-limão, representadas pela bainha envolvendo os feixes vasculares, anatomia Kranz, permitem inferir que a planta apresenta ciclo fotossintético da planta é C_4 conforme descrevem MOHR & SCHOPFER (1995). Estudos realizados por Czepak (2000), através da análise isotópica de plantas de capim-limão, permitem concluir que realmente o ciclo fotossintético da planta é C_4 . Neste trabalho o autor observou valores de -12,92 delta per mil da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, relativo ao padrão internacional PDB ($\delta\text{‰}^{13}\text{C}$, PDB), sendo que plantas de ciclo C_4 apresentam valores entre -9‰ a -16‰.

Estruturas do patógeno puderam ser observadas entre as células dos feixes vasculares, na epiderme da face abaxial. Com a formação das pústulas há desprendimento da cutícula e início da desestruturação do mesofilo com o avanço de estruturas pelas células do parênquima. Dificilmente observou-se o desenvolvimento do patógeno sob células que apresentam reforços de lignina (Figura 8).

São características de fungos causadores de ferrugens a produção de haustórios que retiram nutrientes diretamente do interior das células da planta hospedeira (BEDENDO, 1995). Tal fato pode explicar a presença do fungo em regiões próximas a regiões nas quais é encontrado óleo essencial, cujas substâncias formadoras, podem ser usadas como fonte de nutrição para o fungo.

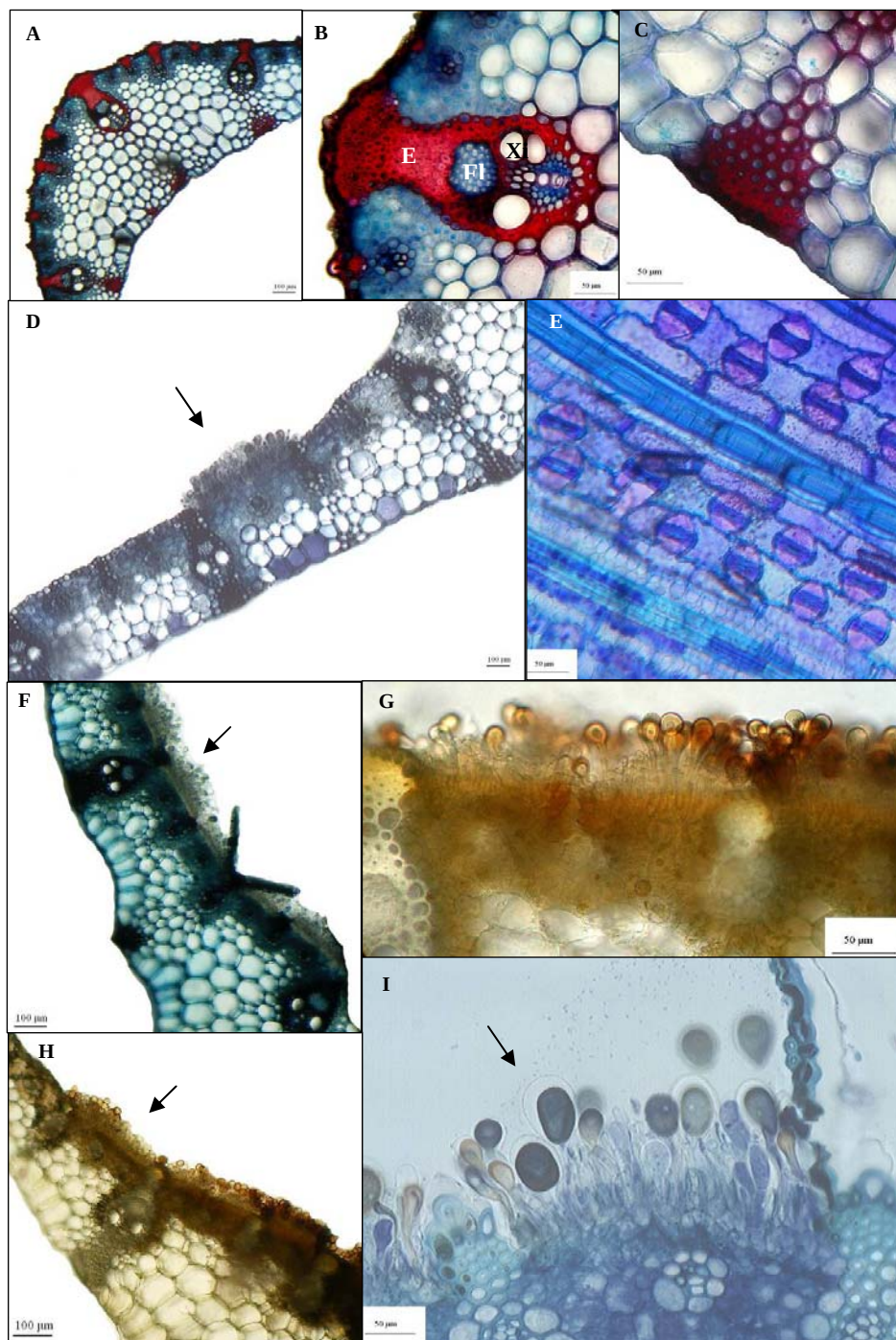


Figura 8. Cortes histológicos de capim-limão e capim-limão infectado por *P. nakanishikii*. A: nervura principal demonstrando a disposição dos feixes vasculares. B: feixe vascular em detalhe Xi (xilema), FI (floema) Es (fibras esclerenquimáticas). C: células esclerenquimáticas junto à epiderme da face adaxial. A, B, C: coloração safranina e azul de toluidina. D: estruturas do patógeno sobre a face abaxial. E: disposição de estômatos da face abaxial. D, E: coloração azul de astrá. F: estruturas do patógeno com desprendimento da cutícula – coloração verde iodo. G: estruturas do patógeno sobre a face abaxial. H: estruturas do patógeno sobre a superfície da face abaxial. G, H – coloração com dicromato de potássio. I: estruturas do patógeno sobre a superfície da face abaxial em detalhe. I: coloração azul de astrá.

Segundo Lewinsohn et al. (1998), o óleo essencial (cital) está presente abaixo das células da epiderme em células do parênquima entre os feixes vasculares, local no qual o patógeno direciona o desenvolvimento suas estruturas.

Através dos testes histoquímicos, as folhas da gramínea sadia apresentaram lipídios comprovado pelo teste de Sudan III, em regiões semelhantes, próximas à região parenquimática que envolve os feixes vasculares, às apresentadas por Lewinsohn et al. (1998). Em folhas infectadas, as regiões nas quais o fungo está presente apresentam-se com coloração mais evidente. Gomes & Negrelle (2003) e Duarte & Zanetti (2004) também descrevem a presença de estruturas de natureza lipofílica em tecidos de capim-limão.

A espécie, tanto para folhas sadias, quanto para infectadas, apresenta ainda alcalóides, sendo o teste positivo para os Reagentes de Bouchardt e Dragendorff. Para os testes de compostos fenólicos, com Cloreto Férrico e Dicromato de Potássio, os resultados foram negativos. Para as folhas infectadas, os resultados para alcalóides foram menos evidentes.

4.3. Trocas gasosas em Capim-limão afetado por *P. nakanishikii*

A grande maioria dos trabalhos que relacionam a variável fotossíntese com severidade de doenças emprega como base o modelo normal ou modificado de Bastiaans (1991). Para o emprego deste modelo é necessário que se conheça a área afetada pela doença, procedimento este realizado através da medição da área foliar sadia e infectada. Buscando facilitar tal procedimento, para o presente trabalho, foi adaptada uma equação baseada numa relação de severidade da doença, obtida através da escala diagramática de notas, com a taxa fotossintética.

Assim, obtiveram-se as seguintes equações e gráficos (Figura 09 e 10) para as duas avaliações. Para a primeira avaliação a equação foi: $FS = 11,5990 - x^{0,6597}$ e para a segunda avaliação obteve-se a equação: $FS = 7,3440 - x^{0,5347}$, sendo x representado pela severidade na escala de notas em porcentagem das áreas afetadas das folhas.

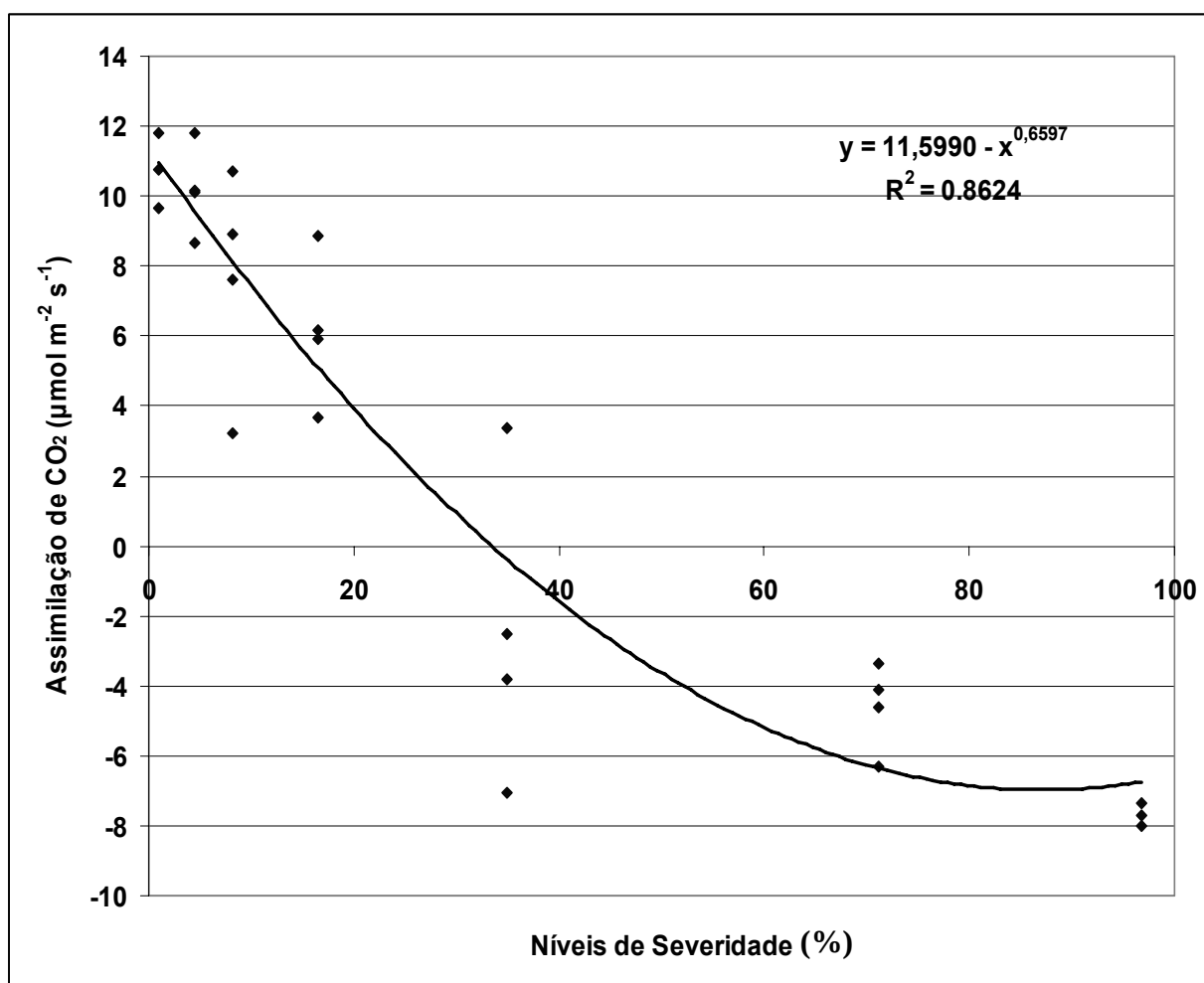


Figura 9. Assimilação líquida de CO₂ em folhas de capim-limão com diferentes severidades de ferrugem para a primeira avaliação – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.

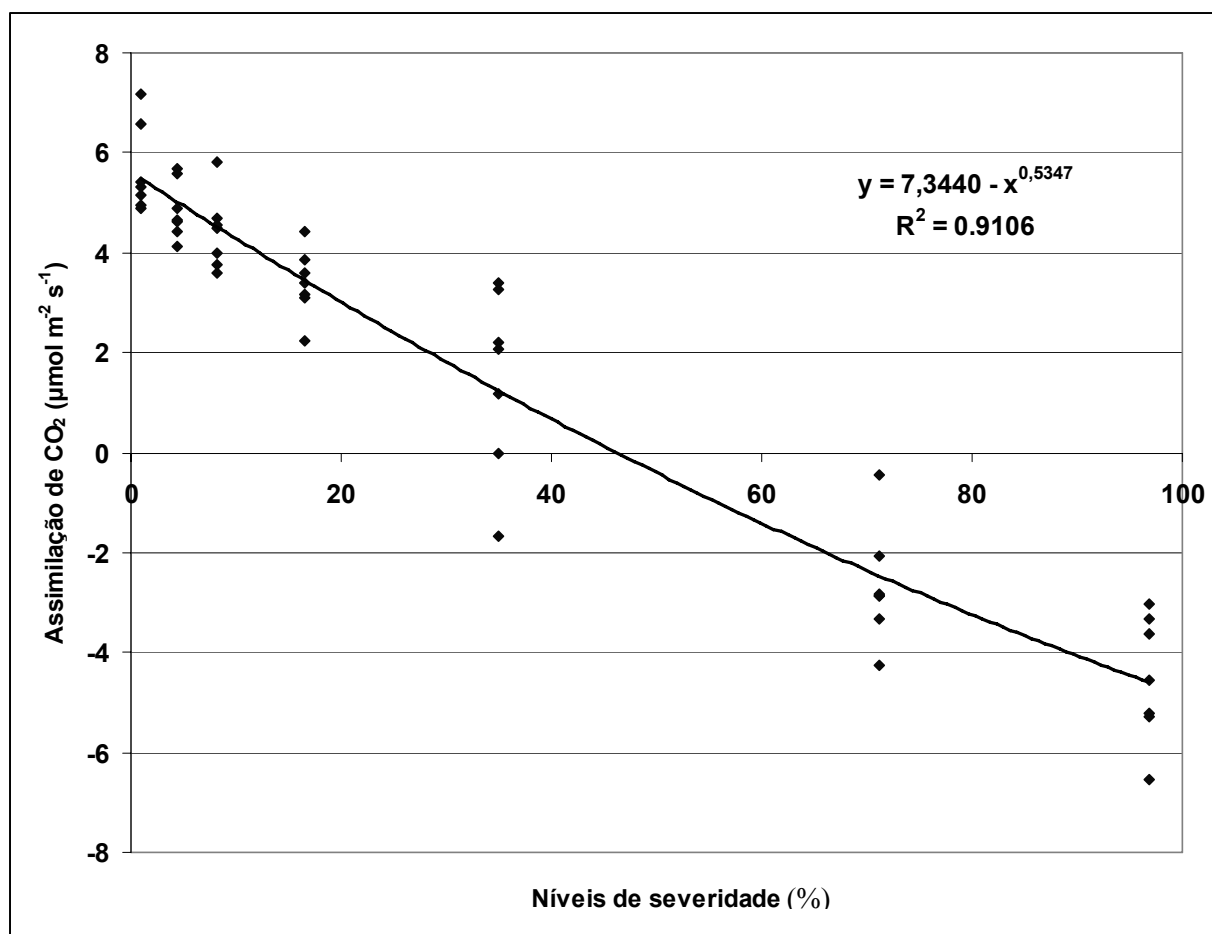


Figura 10. Assimilação líquida de CO₂ em folhas de capim-limão com diferentes severidades de ferrugem para a segunda avaliação – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.

Observa-se geralmente no início da infecção por patógenos um aumento da atividade fotossintética culminando com uma redução desta taxa devido ao surgimento de áreas cloróticas e necróticas, nas quais há destruição de moléculas de clorofila (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Mesmo em severidades menores observou-se uma tendência ao decréscimo da atividade fotossintética da planta. Como complemento do presente experimento, visando-se observar se ocorre este aumento da atividade fotossintética para a

espécie, a realização de um experimento com a inoculação em condições controladas proporcionaria condições adequadas para que se verificasse desde o princípio a influência deste patógeno na atividade fotossintética.

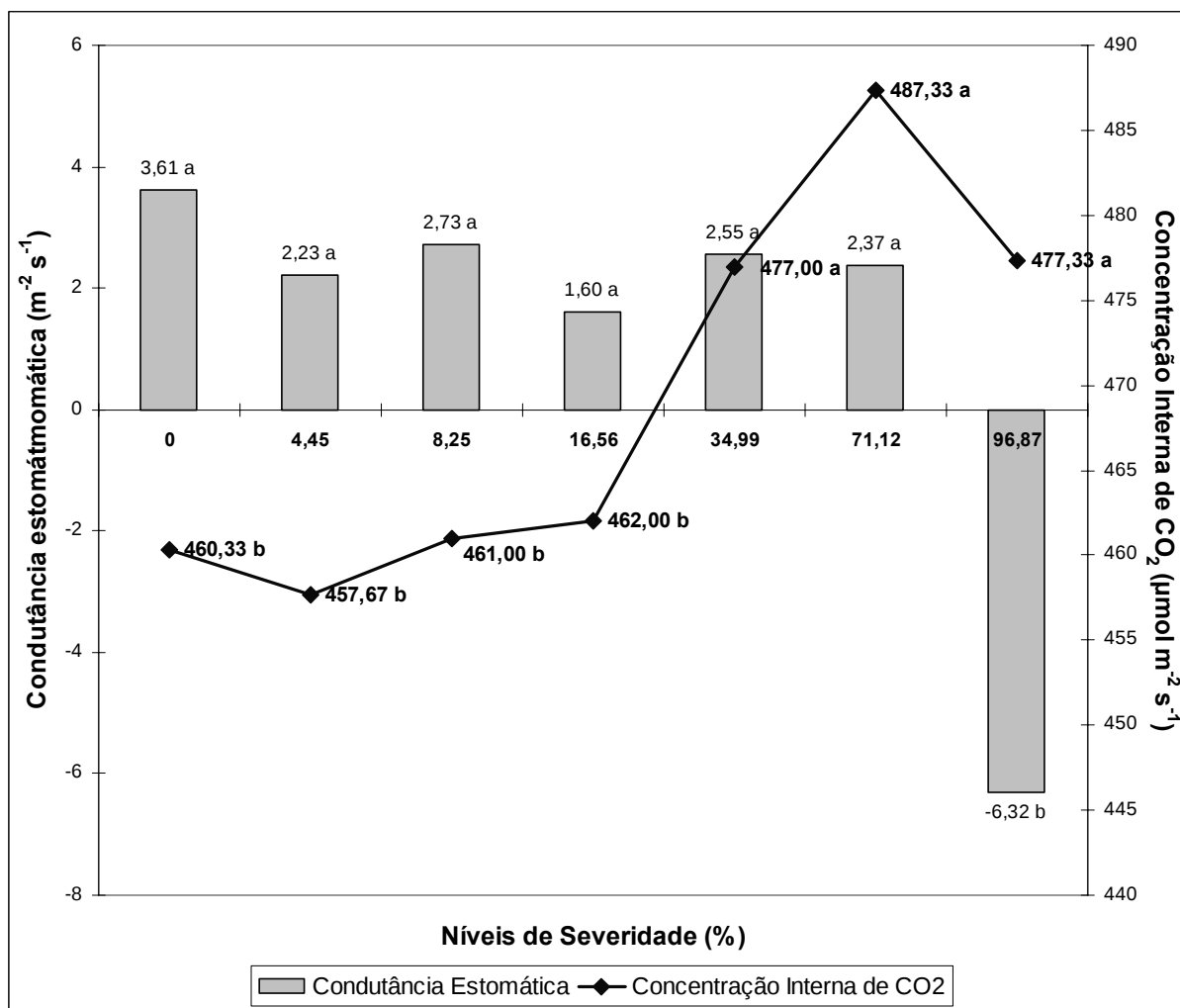
É certo que plantas afetadas por ferrugens têm o comprometimento das funções fotossintéticas devido à retirada de nutrientes promovida pelo fungo e pela destruição de área foliar, com a formação das pústulas (BEDENDO, 1995). Contudo, ainda não são claros os mecanismos moleculares envolvidos nessa redução da fotossíntese. Acredita-se que a resposta ao ataque do patógeno esteja mais relacionada à destruição generalizada do hospedeiro do que a alguma propriedade específica do organismo invasor (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Robert et al. (2005), em um estudo avaliando a fotossíntese em plantas de trigo afetadas pela ferrugem causada por *Puccinia triticina*, demonstraram que a redução fotossintética varia segundo a idade das lesões e que o tipo de lesões deve ser considerado.

Para as duas avaliações realizadas, com condições ambientais diferentes, a taxa de assimilação de CO₂ evidencia tendência, à redução, conforme aumentou a severidade. A mesma tendência é apresentada por Gomes et al (2003) trabalhando com plantas de laranja afetadas pela Clorose Variegada dos Citros (CVC). Em plantas acometidas pela enfermidade, a taxa de assimilação de CO₂ apresentou-se reduzida na maioria dos períodos avaliados.

O padrão de trocas gasosas depende das condições internas e externas da planta, que dependem do clima. Quando um fator se apresenta em nível mínimo pode se tornar limitante para a absorção do CO₂ por certo tempo. Na natureza, raras vezes os fatores externos, por curto espaço de tempo, se harmonizam de forma a favorecerem a ocorrência de picos de fotossíntese (LARCHER, 2006). Um fator ambiental como a presença de um patógeno e sua interação com hospedeiro pode alterar o padrão de assimilação de CO₂, bem como as demais variáveis como a condutância estomática e a concentração interna de CO₂.

Quanto à condutância estomática, apenas para a severidade mais alta na primeira avaliação houve diferença dos outros níveis de severidade (Figura 11). Apesar de esta tendência ser diferente das observações da maioria dos autores, Sadras et al. (2000) também não observaram diferenças na condutância estomática em girassol afetado por *Verticillium dahliae* Klebahn, mesmo havendo redução da taxa fotossintética.

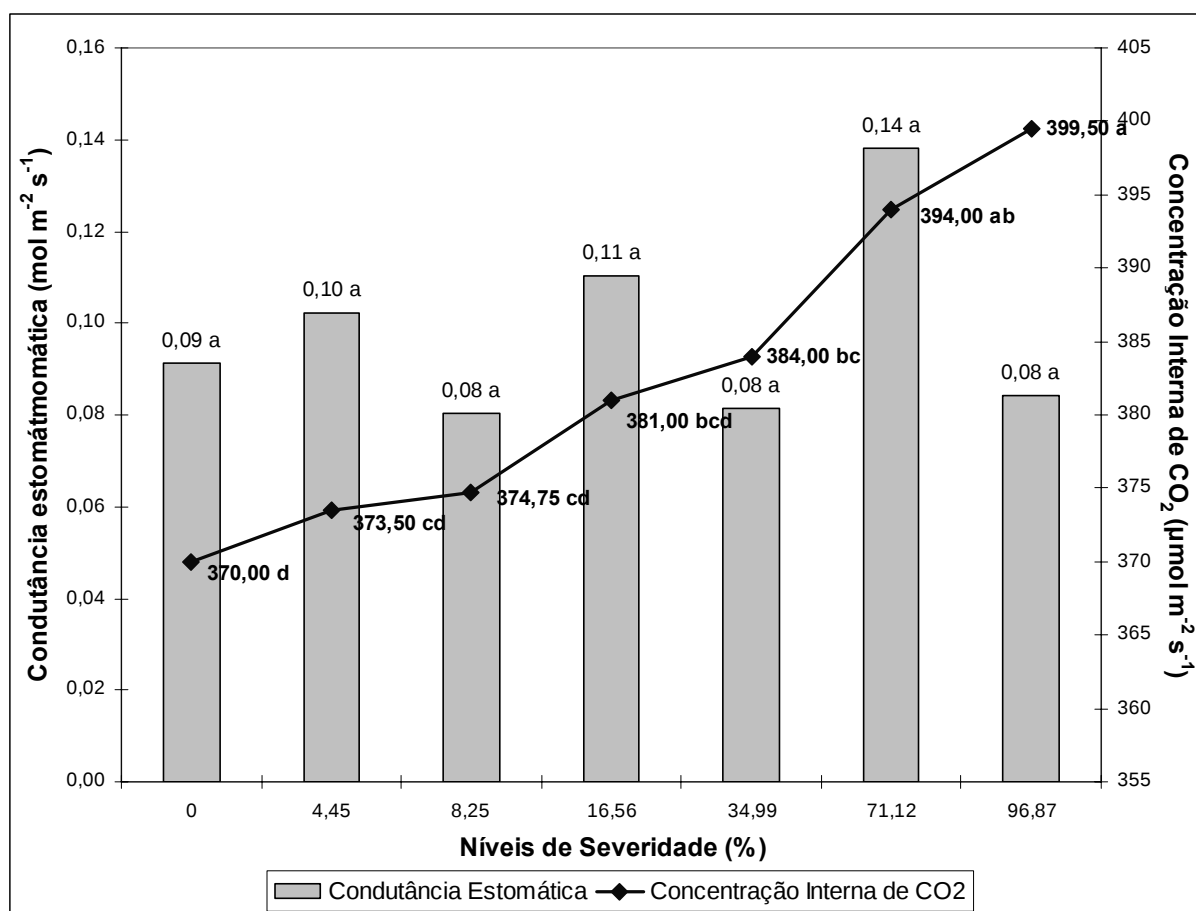


*Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). CV para condutância estomática = 58,761% e para Concentração interna de CO_2 = 1,221%.

Figura 11. Condutância Estomática e Concentração Interna de CO_2 para a primeira avaliação em diferentes severidades da ferrugem em folhas de capim limão – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.

Para a concentração interna de CO_2 para as duas avaliações os valores aumentaram em severidades mais altas (Figura 12). Uma das explicações possíveis é a presença do patógeno sobre a folha da planta em que foram realizadas as medições. Assim, como o patógeno promove a destruturação da cutícula da planta, considerando que a cutícula é um dos obstáculos para entrada de CO_2 na planta, a concentração deste gás tende a ser

maior. Além disso, o patógeno realiza os processos metabólicos na folha liberando CO_2 , contribuindo para o aumento da quantidade de CO_2 , contudo, sem alterar a assimilação deste gás. Em existindo mais CO_2 a taxa de assimilação deveria ser maior. Um dos fatores que levam a não ocorrência disto é o baixo ponto de compensação de CO_2 de plantas de ciclo fotossintético C_4 como é o caso do capim-limão, estas plantas não se beneficiam de altas concentrações de CO_2 (LARCHER, 2006). Plantas C_4 possuem um sistema mais eficiente de captação de CO_2 representado, além da RUBISCO presente nas plantas de ciclo C_3 , pela PEP-carboxilase presente nas bainhas dos feixes vasculares.



*Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). CV para condutância estomática = 30,924% e para Concentração interna de CO_2 = 3,421%.

Figura 12. Condutância Estomática e Concentração Interna de CO_2 para a segunda avaliação em diferentes severidades da ferrugem em folhas de capim limão – Unesp/ Fazenda Experimental de São Manuel – SP, 2008.

Além disso, as enzimas celulolíticas presentes no fungo podem agir sobre o aparato fotossintético presente na planta. Com o desprendimento da epiderme e com a exposição de parte do parênquima, o fungo altera a condição de normalidade dos tecidos da planta, dentre estas alterações algumas enzimas que exercem papel na fotossíntese, como a PEP – Carboxilase podem ser afetadas pela ação do fungo sobre os tecidos, dessa forma reduzindo a capacidade fotossintética mesmo existindo CO_2 . O patógeno ao atuar sobre a planta encontra fonte de nutrição, porém destrói as estruturas da planta, influenciando em suas funções metabólicas.

Petit et al. (2006) trabalhando com uvas (*Vitis vinefra*) afetadas por diversos patógenos como *Phaeomoniella chlamydospora*, demonstram que a redução da assimilação de CO_2 pode estar ligada a limitação de processos internos que ocorrem nas folhas, visto que a concentração interna deste gás é aumentada em plantas doentes. Ligado aos processos afetados inclui-se a baixa atividade de enzimas ligadas ao processo fotossintético como a RUBISCO.

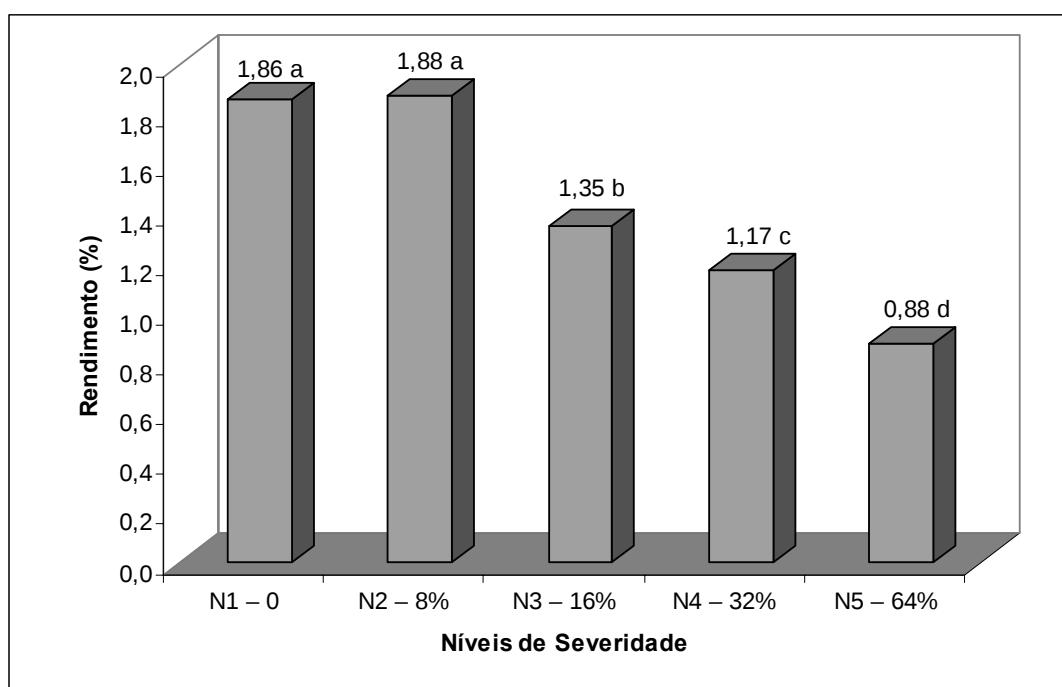
Quando existem condições nas quais há altas concentrações de CO_2 , a fotossíntese é limitada pela capacidade do ciclo de Calvin de regenerar a molécula aceptora ribulose-1,5-bifosfato, que depende das taxas de transporte de elétrons, durante o processo de carboxilação da fotossíntese. Regulando a condutância estomática, a maioria das folhas regula sua concentração intercelular de CO_2 de tal modo que se apresenta intermediária entre as limitações impostas pela capacidade de carboxilação e a capacidade de regenerar a ribulose-1,5-bifosfato (TAIZ & ZEIGER, 2006).

4.4. Óleo essencial em capim-limão afetado por *P. nakanishikii*

Os resultados obtidos demonstraram a redução do rendimento de óleo essencial quanto maior foi a severidade da doença. Em severidades superiores a 8%, segundo as notas de severidade utilizadas, houve redução significativa das quantidades de óleo encontradas para a espécie (Figura 13).

Estes dados confirmam os resultados obtidos por Boruah et al. (1995). Estes autores em trabalho semelhante avaliaram a dinâmica do óleo essencial em plantas afetadas pela mesma doença. Utilizando um índice de porcentagem da doença, empregado para a planta toda, perceberam que quando este índice era superior a 75% havia uma redução de cerca de 37% na quantidade de óleo no campo. Além disso, a composição do óleo era alterada, aumentando componentes de menor interesse como é o caso do mirceno reduzindo a quantidade de geranial.

Hudaib et al. (2002) trabalhando com *Echinaceae purpurea* observaram a redução na quantidade de óleo essencial e variação na composição deste óleo em plantas infectadas por CMV (*cucumber mosaic cucumovirus*). Notadamente, a quantidade do sesquiterpeno, germacreno D é superior em plantas sadias, enquanto a quantidade de monoterpenos é superior em plantas infectadas pelo vírus.



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$), CV (%) 1,969

Figura 13. Rendimento de óleo essencial (%) em capim-limão nas diferentes severidades de ferrugem. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.

A quantidade bruta média de óleo para todos os tratamentos foi de 1,42%, considerando que foram retiradas apenas amostras representativas dos níveis de severidade. Para uma planta inteira totalmente cortada os valores de severidade poderão ser menores devido à existência de folhas mais jovens ainda pouco afetadas.

Em geral, mesmo com as variações obtidas em relação à severidade da doença, outros fatores podem influenciar neste rendimento de óleo. A quantidade e a composição de óleo essencial encontrada para a espécie não é fixa, podendo variar de acordo com a estação, hora do dia, condições de crescimento (solo, adubação, práticas culturais) e carga genética (PENGELLY, 2004). Neste sentido são registrados diversos valores de rendimento de óleo essencial no Brasil para a espécie. Segundo Gomes et al. (2007) a quantidade requerida para a espécie segundo a legislação brasileira, é de 0,5%, sendo que no Estado do Paraná obtém-se cerca de 0,6%. Peisino et al. (2005) obtiveram valores variando de 0,72 a 4,97%, variando as temperaturas e condições de secagem. Figueiredo et al. (2007) em condições semelhantes as da área em que foram obtidas as plantas para a extração do óleo obtiveram valores em torno de 0,38% de óleo.

Como prosseguimento deste estudo recomenda-se a análise cromatográfica de amostras destes óleos para que sejam comparados os componentes nos níveis de severidade. Além disso, pode ser adaptado um índice semelhante ao utilizado por Boruah et al. (1995), que permitirá que se infiram os valores de severidade para a planta toda.

4.5. Testes *in vitro* para a inibição da germinação de esporos de *P. nakanishikii*

Todos os tratamentos empregados mostraram-se eficientes em avaliações *in vitro*. Contudo, os tratamentos representados pelos óleos essenciais de eucalipto (0,02, 0,03 e 0,04%), limão (0,03%) e milfolhas (0,03 e 0,04%) e o extrato pirolenhoso (40 e 50%) inibiram em 100% a germinação dos uredíniosporos do patógeno (Tabela 1).

Tais tratamentos apresentam resultados mais promissores como alternativas de controle, ressaltando o efeito inibitório do óleo essencial de eucalipto. Bonaldo et al (2007), empregando óleos essenciais e extratos da mesma espécie obtiveram resultados positivos na inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e também sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum sublineolum*. Com a mesma espécie Abreu (2006)

também obteve inibição total do desenvolvimento de *Alternaria solani*, com concentrações de $2000\mu\text{L L}^{-1}$ em testes *in vitro*. Medice et al. (2007) estudando a germinação *in vitro* de esporos da ferrugem da soja obtiveram 100% de inibição da germinação destes esporos usando uma concentração de 1% de óleo de eucalipto.

Excluindo os tratamentos citados, todos os outros demonstraram controle eficiente em relação à testemunha como pode ser observado na Tabela 1. No teste com o produto Tween 80, não houve interferência deste produto, utilizado como detergente, na germinação dos esporos do fungo, obtendo valores de germinação de esporos do patógeno comparáveis ao da testemunha. Dessa forma, tal produto pode ser empregado para a emulsificação dos óleos de maneira eficiente em experimentos *in vitro* e, possivelmente, em formulações em campo.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de esporos de *P. nakanishikii* submetidos a diferentes agentes de controle e concentrações de princípios ativos. FCA/ Unesp – Botucatu – SP, 2008.

Agente	Concentrações				
	0,01 %	0,02 %	0,03 %	0,04 %	
Eucalipto	1,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	
Cravo-da-índia	1,00 ^b	2,50 ^b	2,50 ^b	7,00 ^b	
Menta	5,00 ^b	7,00 ^b	6,50 ^b	4,50 ^b	
Palma- rosa	4,50 ^b	0,50 ^b	7,00 ^b	5,00 ^b	
Limão	2,50 ^b	3,00 ^b	0,00 ^b	3,00 ^b	
Mil - folhas	3,00 ^b	1,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	
Citronela	0,50 ^b	0,50 ^b	0,50 ^b	0,00 ^b	
Mentol	9,50 ^b	7,50 ^b	4,00 ^b	1,00 ^b	
Concentrações					
	10%	20%	30%	40%	50%
Extrato Pirolenhoso	4,00 ^b	0,50 ^b	2,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
Fungicida (Mancozeb)			2,50 ^b		
Tween 80			82,50 ^a		
Testemunha			88,00 ^a		
CV %			38,41		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem da testemunha pelo teste de Dunnet ($P > 0,05$), dados transformados em arc seno.

Em relação ao extrato pirolenhoso, as duas concentrações mais altas propiciaram 100% de inibição na germinação dos esporos do patógeno. As demais concentrações mostraram-se altamente eficientes.

Para os tratamentos com óleos essenciais, todos demonstraram controle em relação à testemunha. Ressaltando os valores obtidos para os óleos de eucalipto, mil-folhas, citronela e limão, Mccalley & Torres-Grifol (1992) citados por Abreu (2006) indicam que o óleo de limão é pouco eficiente na inibição de microorganismos, contudo apresentam especificidade para certos fungos ou bactérias. Neste caso, para esporos deste patógeno, foi eficiente. Quanto à espécie mil folhas, Fiori et al (2000) demonstram o efeito de extratos de folhas e do óleo essencial desta espécie na redução da germinação de esporos de *Dydimela bryoniae*, embora seu efeito sobre o crescimento micelial do fungo não sr tão pronunciado.

Para o mentol, todas as concentrações utilizadas de princípios ativos foram eficientes em relação à testemunha. Considerando que o mentol não pode ser solubilizado em água necessita-se de formas diferenciadas de dissolução a fim de aprimorar o uso deste composto.

Para a concentração de 0,01%, os tratamentos superiores em relação à testemunha foram os óleos essenciais de eucalipto, cravo e citronela (Tabela 2). Para a concentração de 0,02% foram superiores a testemunha os óleos essenciais de eucalipto, mil-folhas e citronela e o extrato pirolenhoso. Para a concentração de 0,03% os óleos de eucalipto, limão, mil-folhas e citronela, Para 0,04% todos os tratamentos mostraram-se de grande eficiência.

Todos os tratamentos em relação ao padrão químico apresentaram eficiência, demonstrando potencial para utilização em campo.

Tabela 2. Germinação de Esporos de *P. nakanishikii* submetidos a diferentes agentes de controle em concentrações de princípios ativos. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.

Agente	Concentrações			
	0,01 %	0,02 %	0,03 %	0,04 %
Eucalipto	1,00 ^c	0,00 ^{**}	0,00 ^{**}	0,00 ^{**}
Cravo	1,00 ^c	2,50 ^{bc}	2,50 ^{bc}	7,00 ^b
Menta	5,00 ^{bc}	7,00 ^b	6,50 ^b	4,50 ^b
Palma- rosa	4,50 ^{bc}	0,50 ^c	7,00 ^b	5,00 ^b
Limão	2,50 ^{bc}	3,00 ^{bc}	0,00 ^{**}	3,00 ^b
Mil - folhas	3,00 ^{bc}	1,00 ^c	0,00 ^{**}	0,00 ^{**}
Citronela	0,50 ^c	0,50 ^c	0,50 ^c	0,00 ^{**}
Mentol	9,50 ^b	7,50 ^b	4,00 ^b	1,00 ^b

	Concentrações			
	10%	20%	30%	40%
Extrato Pirolenhoso	4,00 ^{bc}	0,50 ^c	2,00 ^{bc}	0,00 ^{**}
Fungicida	2,50 ^{bc}	2,50 ^{bc}	2,50 ^{bc}	2,50 ^b
Testemunha	88,00 ^a	88,00 ^a	88,00 ^a	88,00 ^a
CV %	35,72	33,21	23,96	30,01

* Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$),

** Valores não considerados para análise por tratarem-se de valores zero.

As concentrações empregadas não demonstram uma relação linear quanto à inibição da germinação, o que pode ser observado para o óleo de limão, por exemplo, no qual a concentração de 0,03% apresentou melhores resultados que 0,04%. Tendência semelhante foi observada por Abreu (2006) para o controle *in vitro* de *Alternaria solani*. Isto pode ser explicado pela heterogeneidade dos produtos no meio de cultura. Para contornar este problema quanto às concentrações, necessita-se um tipo de formulação, através de produtos emulsificantes que melhorem a homogeneização dos óleos nos meios de cultura. Neste sentido, um fator que auxilia nessa homogeneização é a incorporação dos óleos ao meio de cultura empregado em contraposição à metodologia empregada por Medice et al. (2007), na qual o óleo essencial é apenas espalhado sobre a superfície do meio de cultura.

Apesar de produtos naturais, como extratos, serem muito pesquisados como agentes de controle de doenças estudos com óleos essenciais são recentes e escassos

para este fim. Tal fato se deve ao alto valor de alguns óleos associado à dificuldade em realizar formulações a partir destes por tratarem-se de produtos insolúveis em água.

Os resultados obtidos com o emprego destes óleos corroboram os resultados obtidos por Medice et al. (2007). Utilizando óleos de *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson (eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela), *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) e *Thymus vulgaris* (L.) (tomilho), em concentrações mais altas que as testadas no experimento e variáveis para as espécies, obteve-se eficiente controle da germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd agente etiológico da ferrugem asiática da soja.

Fiori et al. (2000) usando concentrações semelhantes de óleos essenciais de *C. citratus*, *A. millefolium*, *Ageratum conyzoides* e *C. citriodora* às empregadas no trabalho obtiveram resultados significativos na redução do crescimento micelial e na inibição da germinação de esporos de *Dydimela bryoniae*. Neste trabalho os autores empregaram concentrações variando de 20 a 1000 µL, sendo que em concentrações a partir de 20 µL houve controle da germinação dos esporos.

Mesmo com os resultados promissores apresentados por alguns óleos essenciais, como por exemplo, o óleo de mil-folhas, optou-se por óleos de mais fácil obtenção e disponibilidade de aquisição. O rendimento em óleo essencial para mil-folhas obtido através da massa fresca da planta é muito baixo variando de 0,5 a 0,8% (CORREA JR. et al., 1991). Outro fator foi à viabilidade econômica. Óleos de citronela e eucalipto apresentam valores entre R\$25,00/L a R\$50,00/L enquanto óleos como o de mil-folhas apresenta valores de aproximadamente R\$300,00/L.

O mentol é utilizado em concentrações baixas e é comprado em forma de cristais apresentando valores mais baixos que o óleo essencial da menta. O extrato pirolenhoso é facilmente encontrado comercialmente e apresenta valores de R\$10,00 a R\$15,00/L.

4.6. Testes em campo para a inibição da germinação de esporos de *P. nakanishikii*

Para a primeira etapa do experimento, no qual as plantas encontravam-se afetadas pela doença em severidades que variavam de 10 a 50%, as aplicações dos produtos

resultavam na redução da esporulação do patógeno, observável visualmente através da diminuição da massa de esporos liberada, mas dificilmente quantificável através das metodologias encontradas.

Quanto à incidência, todas as folhas observadas apresentavam-se afetadas pelo patógeno em todas as avaliações. Através de avaliações visuais e a comparação com a escala diagramática, não foram observadas diferenças quantificáveis no período que compreende do início ao fim das aplicações dos tratamentos, através da avaliação da quinta folha do perfilho mais central da planta, não sendo possível elaborar uma curva de progresso da infecção. A cada semana, com o crescimento contínuo da planta, havia variação na folha a ser avaliada e a cada semana as novas folhas apresentavam severidade semelhante à avaliação anterior para todos os tratamentos, considerando também a difícil marcação da folha e do perfilho que eram avaliados.

A avaliação da severidade realizada após cinco aplicações dos produtos através de análise de imagens digitais é apresentada na Tabela 3. Todos os tratamentos, com exceção do extrato pirolenhoso, mostraram controle em relação à testemunha.

Tabela 3. Princípios ativos no controle da ferrugem do capim-limão em condições de campo. FCA/ Unesp, Botucatu – SP, 2008.

Produto	% de área foliar infectada 1ª Avaliação	% de área foliar infectada 2ª Avaliação
Testemunha	36,119 ^{a*}	2,5075 ^{a1}
Fungicida	19,550 ^b	0,2635 ^b
Extrato pirolenhoso	22,295 ^{ab}	1,3960 ^{ab}
Óleo essencial de Citronela	18,991 ^b	1,0190 ^{ab}
Mentol	16,713 ^b	1,7185 ^{ab}
Óleo essencial de Eucalipto	13,887 ^b	0,9615 ^{ab}
CV %	33,844	37,352

* Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

¹ Dados transformados para arc sen√

Após a primeira colheita realizada após esta avaliação, as folhas senescentes e restos culturais foram eliminados da área. Quinze dias depois do corte os primeiros sintomas da doença começaram a aparecer nas folhas novas que iniciavam o desenvolvimento. Com trinta dias do corte, as plantas estavam com cerca de 50 cm de altura. Aos quarenta e cinco dias após o corte, na segunda avaliação da severidade, as plantas apresentavam aproximadamente 80 cm de altura. Os valores de severidade foram inferiores para a segunda avaliação em todos os seis tratamentos.

Para a segunda avaliação o tratamento com o fungicida mostrou-se superior a testemunha. Os demais tratamentos não diferiram significativamente. A realização da colheita com a eliminação de restos culturais mostra-se eficiente para o controle da doença, o que pode ser observado nos valores inferiores apresentados na segunda avaliação, quarenta e cinco dias após a colheita. Intervalos maiores entre colheitas podem prejudicar a qualidade do produto, pois haverá o aumento da severidade da doença, prejudicando a aparência da matéria prima que apresentará mais sintomas da doença.

MAY et al. (2008) em trabalho com a espécie *Cymbopogon citratus* demonstrou um decréscimo linear no acúmulo de massa seca segundo o aumento de intervalos de corte, apresentando como ideal um intervalo de 40 dias entre os cortes. Esse intervalo além de favorável para uma boa acumulação de matéria seca mostra-se eficiente para o controle da ferrugem em campo.

Aliado ao corte, a adoção da pulverização com produtos que apresentam algum efeito sobre a redução do inóculo pode auxiliar na melhor condição sanitária do cultivo.

Quanto aos produtos empregados, os óleos essenciais demonstram serem eficientes, necessitando apenas de ajustes quanto à concentração e forma de aplicação a ser utilizada. Para uma melhor distribuição dos óleos sobre a superfície foliar, a elaboração de uma formulação, com um agente emulsificante é necessária.

Da mesma forma, para o mentol são necessários ensaios de formulação, adaptando um elemento no qual fosse adequadamente dissolvido o produto comercial. A partir disto partir-se-ia para novos testes de concentrações para aplicação, visto que apresenta um resultado pronunciado, tanto para ensaios in vitro quanto em campo.

O extrato pirolenhoso necessita de adequações quanto à dose a ser aplicado, visto que demonstrou, nos testes *in vitro*, como um dos melhores produtos para o controle da doença.

Para ensaios em campo com tomate, ABREU (2006) obteve controle da pinta-preta do tomateiro, *Alternaria solani*, com a utilização de óleos essenciais de cravo, eucalipto e de capim limão. CASA (2008), testando produtos para controle fitossanitário não observou controle eficiente com o emprego de óleos essenciais. Contudo, a eficiência deve ser avaliada segundo as condições ambientais, além da propriedade de alta volatilidade inerente aos óleos essenciais.

Muitos são os trabalhos com controle *in vitro*. Contudo, ainda são poucos os resultados que podem ser aplicáveis em campo, principalmente com óleos essenciais. Tais compostos, além de voláteis, necessitam de adequações quanto às concentrações a serem aplicadas e a tecnologia de aplicação a eles destinada.

São raros os trabalhos com doenças em plantas medicinais. Metodologias ainda necessitam serem adaptadas para que se torne mais eficiente a forma de avaliação destas enfermidades. Gramíneas, como o trigo, podem ser avaliadas quanto ao efeito de doenças na produção final obtida através do produto, no caso, os grãos. Forrageiras podem ser avaliadas quanto à produção de sementes (MARCHI et al., 2008). Contudo, plantas como o capim-limão cujo produto são as próprias folhas torna-se difícil avaliar o efeito da doença na produção de matéria seca.

A doença não prejudicou a produtividade das plantas, mas interferiu na qualidade da matéria prima. Com o aumento da severidade notou-se que há redução da quantidade de óleo essencial, como para a primeira avaliação não foi feita a avaliação de óleo essencial acredita-se que para esta época poderiam existir diferenças visto que as plantas encontravam-se em piores condições sanitárias. Já para a segunda avaliação, na qual o período de corte foi menor, as severidades encontradas foram bem menores que na primeira avaliação, propiciando uma boa produtividade de matéria seca.

A produção para todos os tratamentos em toda área foi estimada em 4,260t/ha de massa seca ao final da segunda avaliação, considerando um espaçamento de 0,5 x 0,5m. A produção de óleo média para os tratamentos foi de 1,80%, o recomendado segundo a

Farmacopéia (2003) é de 0,5%. Não houve diferenças consideráveis entre produtividade e quantidade de óleo nos tratamentos avaliados ao fim da segunda avaliação.

O material vegetal seco apresentou-se semelhante na maioria dos tratamentos. Contudo, visualmente, a testemunha apresentou mais manchas resultantes da doença e o tratamento com o fungicida apresentou resíduos representados por manchas brancas, referentes às aplicações do produto, no tecido vegetal (Figura 14). Segundo o desenvolvimento da espécie, esta apresenta senescência natural juntamente com o surgimento de folhas mais jovens, o que pode ser observado no material vegetal seco.



Figura 14. Aspecto geral das drogas vegetais originadas do experimento de capim-limão (*C. citratus*) empregado para a avaliação de agentes controladores da ferrugem em campo, em pleno cultivo. 1- Testemunha 2 – Fungicida 3 – Extrato Pirolenhoso 4 – Óleo de Citronela 5- Mentol 6 – Óleo de Eucalipto

Pela dimensão apresentada pela planta, aproximadamente 25 perfilhos com 6-10 folhas por perfilho e de 80-100 cm de altura, é difícil adaptar uma escala de notas para a planta toda. BORUAH et al., (1995) empregou um índice percentual de doença embasado em uma escala de quatro categorias e uma equação que envolve a média de notas

obtidas nas amostras e o total de folhas afetadas. Contudo, este índice torna-se de difícil aplicabilidade em condições de campo e com repetições periódicas.

Uma adaptação desta equação poderia ser empregada através da amostragem periódica de um determinado número de folhas e a avaliação minuciosa destas por imagem digital, através de softwares específicos para a análise de doenças, ou com auxílio de outros artifícios como, por exemplo, um medidor de área foliar.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A condição de doença apresenta-se como um fator limitante para as culturas com importância econômica como pode ser observado para a maioria das culturas. Apesar do grande crescimento do mercado de plantas medicinais, não há estudos específicos e conclusivos a respeito de doenças que acometem este tipo de cultivo, nem de produtos que podem ser aplicados sem interferirem na qualidade.

A ferrugem do capim-limão demonstra-se como uma doença importante para o cultivo desta espécie, apesar de afetar diretamente a taxa fotossintética da planta e a quantidade de óleo, não altera a produção de matéria vegetal em pequenos períodos entre cortes. Contudo, torna-se importante a qualidade da matéria prima produzida que é reduzida em infecções altas.

Agentes de controle de doenças representados por óleos essenciais de plantas medicinais demonstram-se promissores. Para que sejam viáveis para o emprego em campo, alguns fatores devem ser considerados como, por exemplo, a viabilidade econômica. Neste sentido, os óleos de eucalipto e citronela demonstram-se como agentes de controle efetivos para a enfermidade e acessíveis para o emprego em cultivos comerciais.

Ainda, necessita-se o desenvolvimento de novas tecnologias de aplicação destes produtos, bem como a elaboração de formulações mais efetivas que possam estabilizar os princípios ativos contidos nos óleos. Tal observação vale também para o mentol.

Além destes, o extrato pirolenhoso demonstra-se com bons resultados para o controle da ferrugem do capim limão. Para uma maior efetividade dos produtos, necessita-se a adaptação de uma concentração adequada, que realize o controle do patógeno e não cause problemas com fitotoxidez para a planta.

6. CONCLUSÕES

- O patógeno atua na superfície foliar da planta reduzindo a qualidade da matéria prima vegetal, sendo necessárias formas de manejo da doença.
- Há redução da assimilação de CO₂ conforme há o aumento da severidade da doença, há influência também na quantidade de óleo essencial que é reduzida severidades mais altas.
- Óleos essenciais (eucalipto, palmarosa, cravo-da-índia, menta, limão, citronela e mil folhas), solução de mentol e extrato pirolenhoso de *Corymbia citriodora* demonstram-se eficientes para o controle em condições in vitro da germinação de esporos de *P. nakanishikii*
- Óleos essenciais de citronela e eucalipto, mentol e extrato pirolenhoso são formas alternativas de controle da ferrugem em condições de campo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**, 2006, 71f., Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas. Botucatu, 2006.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. London, UK: Elviesier Academic Press. 2005. 530 p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W., BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed., New York: John Wiley, 1996, 869p.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003, p.87-107.
- BARBOSA, L. C. S.; Morfoanatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae) Revista Biologia Neotropical, Goiânia, v.4 n.1, p. 80-81, 2007.
- BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n.6, p.611 – 615, 1991.

BEDENDO, I. P. Ferrugens In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. E AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.417-453.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, Lancaster, n.127, p.617-633, 1997.

BERGAMIN FILHO, A. Agricultura, fitopatologia e desenvolvimento sustentável **Fitopatologia Brasileira**, Maringá, v. 32 suplemento, ago 2007, p. s9– s10.

BOFF, P. (COORD.) **Agropecuária saudável: da prevenção de doenças, pragas e parasitas à terapêutica não residual**. Lages: Epagri/ Udesc, 2008. 80p.

BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 29, p.128-134. 2004.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Contribution for the study of antifungal and phytoalexins elicitors in sorghum and soybean activities by eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p. 383-387, 2007.

BORUAH, P.; MISRA, B. P.; PATHAK, M. G.; GHOSH, A. C. **Dynamics of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. under rust disease indices**, Journal of Essential Oil Research, Beltsville, v.7, p.337-338, 1995.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 007** de 17 de maio de 1999. Estabelece normas para a produção orgânica vegetal e animal. Diário Oficial da União. Brasília, n. 94, 19 de maio de 1999.

BRASIL. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 60p.

CAPORAL, F. R. **La extensión agraria del sector público ante los desafíos del desarrollo sostenible: el caso de Rio Grande do Sul, Brasil**. Córdoba, 1998. 517p. (Tese de Doutorado) Programa de Doctorado en Agroecología, Campesinado e Historia, ISEC-ETSIAN, Universidad de Córdoba, España, 1998.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável: perspectivas para uma nova Extensão Rural. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.1, n.1, p.16-37, 2000.

CARVALHO, W.A.; ESPINDOLA, C.R. & PACCOLA, A.A. **Levantamento de solos da Fazenda Lageado-Estação Experimental "Presidente Médici"**. Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1983. 95p.

CASA, J. **Controle Fitossanitário no cultivo do tomateiro nos sistemas orgânico e biodinâmico de produção**, 2008, 81f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – UNESP- FCA Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, 2008.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas** Guaíba: Agropecuária, 1995, 196p.

CONCEIÇÃO, D. M.; LORENZETTI, E. L.; SACRAMENTO, L. V. S.; FURTADO, E. L. Controle de *Puccinia cymbopogonis* in vitro com óleos essenciais, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 13, 2008 (resumo).

CONFORTO, E. C.; ANDREOLI, R. P. Aspectos anatomo-fisiológicos de plantas de interesse medicinal. **Revista Hispeci & Lema**, Bebedouro, v. 7, p. 26-29, 2003.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L. C., SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**, Curitiba: Emater – SEAB - PR, 1991, 151p.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L. C., SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**, Jaboticabal: FUNEP, 1994, 162p.

CORREA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**, Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006, 76p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, FJ. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981, 210 p.

CUNHA, A.R.; KLOSOWSKI, E.S.; GALVANI, E.; SCOBEDO, J.F.; MARTINS, D. Classificação climática para o município de Botucatu-SP, segundo Koppen. In: SIMPÓSIO EM ENERGIA NA AGRICULTURA, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 1999. p.487-491.

CZEPAK, M.P. **Produção de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e *Elionorus latiflorus* Ness em diferentes arranjos espaciais**, 2000, 97f. Tese (Doutorado em Agronomia – Agricultura) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas. Botucatu, 2000.

DAVID, E. F. S. **Desenvolvimento, trocas gasosas, rendimento e composição de óleo essencial de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com variação dos níveis de N, P, K e Mg**, 2007, 132f. Tese (Doutorado em Horticultura) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007.

DUARTE, M. R.; ZANETI, C. C. **Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF, POACEAE** Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 117-124, Jul.- Dez./2004.

ELLIS, M. A.; FERREE, D. C.; SPRING, D. E. Photosynthesis, transpiration and carbohydrate content of apple leaves infected by *Podosphaera leucotricha* **Phytopathology**, St. Paul, n. 71, p. 392- 394, 1981.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**; São Paulo, Editora: Edgard Blucher, 1974, 293 p.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 220-220-5. parte 1.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal** – Principais Doenças Florestais do Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FIGUEIREDO, R.O.; DELACHIAVE, M.E.A.; MING, L.C. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.3, p.31-35, 2006.

FIORI, A. C. G.; SCHAWN-ESTRADA, K.R. F.; STANGARLIN, J. R.; VIDA, J. B.; SCAPIM, C. A.; CRUZ, M. E. S.; PASCHOLATI, S. F. Antifungal activity of leaf extracts

and essential oils of some medicinal plants against *Dydimella bryoniae* **Journal of Phytopathology**, Berlín, 148, p.483-487, 2000.

GARDNER, D.E. Lemongrass rust caused by *Puccinia nakanishikii* in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, n.12, p.1100, 1985.

GEORGE, C. K. Organic spices In: PETER, K. V. (edit.) **Handbook of herbs and spices** Boca Raton: CRC Press, 2001, p. 34-38.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processo ecológicos em agricultura sustentável**. 2ªed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2001, 653p.

GODOY, C.V., AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.209-215. 2001.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, E. C.; DONI FILHO, L. Caracterização da produção de capim-limão no Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.4, p. 385-390, 2007.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137- 144, jul-dez, 2003a.

GOMES, M. M. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L.; MACHADO, M. A. Gas exchanges and carbohydrate metabolism in orange trees with citrus variegated chlorosis **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, 15(1):25-31, 2003b.

GONZALEZ, J. C. A.; COLMENARES, N. G.; USUBILLAGA, A.; DARGHAN, E.; LINARES, S. Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial, **Interciência**, Caracas, v. 33, n. 9, p. 693-699, sep. 2008.

GUPTA, R. Agrotechnology of medicinal plants. In: WIJESEKERA, R. O. B. **The medicinal plant industry**, CRC Press: Boca Raton, 1991, 43-58p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao**

medicamento Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 5ª ed., 2004, p. 13-28.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAMMERSHIMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Dublin, v. 107, p. 1-6, 2001.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. Academic Press: San Diego, 1993, 318p.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary**, 2ª ed., 1999, p.605 e 611.

HUDAIB, M.; CAVRINI, V.; BELLARDI, M. G.; RUBIES-AUTONELL, C. Characterization of the essential oils of healthy and virus infected *Echinacea purpurea* (L.) Moench plants. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, 2002, p 427 - 430.

KEEN, N. T.; YOSHIKAWA, M.; WANG, M. C. Phytoalexin elicitor activity os carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* and other sources. **Plant Physiology**, v. 71, p. 466-471, 1983.

KHATOUNIAN, C. A. **A reconstrução ecológica da agricultura**, Botucatu: Agroecológica, 2001, 348p.

KOIKE, S.T. Rust disease on lemongrass in California. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.6, p. 304, 1999.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 319p.

LEE, Y. S.; KIM, J.; SHIN, S. C.; LEE, S. G.; PARK, I.K. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour Fragrance Journal**, n. 23, p. 23–28, 2008.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMORÆ, Y.; KATZIR, I., RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical Localization of Citral Accumulation in Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany** v. 81,p. 35-39, 1998.

LIMA, C. S. **Doenças fúngicas em plantas medicinais em Lavras, Minas Gerais.** 2002, 65 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2002.

LORENZETTI, E. L.; CONCEIÇÃO, D. M.; SACRAMENTO, L. V. S.; FURTADO, E. L. Controle de *Puccinia cymbopogonis* in vitro com emprego de preparados homeopáticos, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34 (suplemento), p. 44-45, 2008 (resumo).

LORENZETTI, E. R., CONCEICAO, D. M., MASSON, M. V., PORCENA, A. S., FURTADO, E. L., SACRAMENTO, L. V. S. Escala diagramática para determinação de área foliar lesionada para a ferrugem do capim-limão, **Tropical Plant Pathology**, Belo Horizonte, v. 33 (suplemento), p. 304, 2008 (resumo).

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas** Nova Odessa: Plantarum, 2008, 544p.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C.L.; MARIN, F. R.; SILVA, J. A. B.; SILVA, S. R. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranjeira ‘Natal’ com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.6, p.911-918, jun. 2006.

MALLAVARAPU, G. R.;RAJESWARA RAO, B. R.; KAUL, P. N.; RAMESH, S.; BHATTACHARYA, A. K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 167 – 169, 1998.

MARASCHIN-SILVA, F. **Verificação da eficiência dos bioensaios com extratos aquosos no diagnostico de potencial alelopático: contribuição ao estudo das espécies nativas brasileiras.** 2004, 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D. ; ANACHE, F. C. ; FABRIS, L. R. . Progresso e controle da mela-das-sementes (*Claviceps maximensis*) de *Brachiaria brizantha*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, p. 241-247, 2008.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S.H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Campinas. v. 25, p. 429-432, 2007.

MARQUES, J. P. R.; FREITAS-ÁSTUA, J.; KITAJIMA, E. W.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.11, p.1531-1536, nov. 2007.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**, Editora da UFV: Viçosa, 2000, 220p.

MARTINS, M. B. G.; MARITNS, A. R.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A.J. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.6,n. 3, p. 20-29, 2004.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000.

MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas. 2ªed. Fortaleza: UFC, 1994. 108 p.

MAY, A.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B.; MORAES ARA; PINHEIRO MQ; MARIO M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, Campinas v. 26, p. 379-382, 2008.

MEDEIROS, R.B. de; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 90p.

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

MELO, M. P.; ARAUJO, J. S. P.; CARVALHO, J. A. A.; TOSTES, O. G.; ÁREAS, S. M. *Puccinia nakanishikii*, nova ocorrência de ferrugem em capim-limão (*Cymbopogon citratus*) no Brasil, **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33 (suplemento), p. 241, 2008. (resumo)

MIZUBUTTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. Aplicações de princípios de controle no manejo ecológico de doenças de plantas In: **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte v. 22, n.212, set./out. 2001, p. 9 – 18.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. Nova Yorque: Springer, 1995. 629p.

MORAES, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, s/n, 1992, p. 175-190.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, 2007, p.80-92.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 2003, 188p.

PARDO-CARDONA, V.M. La roya del limoncillo, una nueva enfermedad para Colombia y Sur America. **Fitopatologia Colombiana**, Medellin v.23, n.1/2, p.43-44, 1999.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. E AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 417-453.

PEISINO, A. L.; ALBERTO, D. L.; BAHIA, G. S. S.; MENDES, M. F.; CALÇADA, L. A. Determinação de parâmetros na secagem do *Cymbopogon citratus* (capim-limão) In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2005, 6p.

PENGELLY, A. **The constituents of medicinal plants** 2ª ed., CABI: Whashington, 2004, 172p.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun, 2008.

PETER, K.V. Introduction In: PETER, K. V. (edit.) **Handbook of herbs and spices** Boca Raton: CRC Press, 2001, p. 1-7.

PETIT, A. N.; VAILLANT, M.; BOULAY, C.; CLÉMENT, C.; FONTAINE, F. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by Esca. **Phytopathology**, St. Paul, v.96,n. 10, p. 1060-1065, 2006.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais**. Piracicaba: Fealq, 2002, 309p.

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; CASALI, V. W. D.; CARDOSO, A. A. In Vitro Effect of Plant Leaf Extracts on Mycelial Growth and Sclerotial Germination of *Sclerotium cepivorum*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 46, p. 421 – 425, 2008.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: Editora da UFLA, 2002, 169p.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v.3, p.577; 1984.

PURKAYASTHA, R.P. **Progress in phytoalexin research during the past 50 years**. In: DANIEL, M. & PURKAYASTHA, R. P. Handbook of phytoalexin metabolism and action. Marcel Dekker: New York, 1995, 615p.

RANASINGHE , B. JAYAWARDENA AND K. ABEYWICKRAMA Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 208–211, 2002.

REIS, M. D.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais In: SIMÕES. C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004.

RIBEIRO, P. G. F; DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais** Londrina: IAPAR, 2008, 218p.

ROBERT, C.; BANCAL, M. O.; NEY, B.; LANNOU, C. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status, **New Phytologist**, v.165, p. 227–241, 2005.

SADRAS, V. O.; QUIROZ, F.; ECHARTE, L.; ESCANDE, A.; PEREYRA, V. R. Effect of *Verticillium dahliae* on Photosynthesis, Leaf Expansion and Senescence of Field-grown SunFlower **Annals of Botany**, v. 86, p.1007-1015, 2000.

SAITO, M.L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**, Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, 48p., 2000.

SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; MAFFIA, L. A.; ALFENAS, A. C. Importância da estrutura da superfície foliar na interação *Phytophthora capsici* - *Hevea brasiliensis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p.67-80, jul./dez. 1999.

SANTOS, R. H. S.; MENDONÇA, E. S.; Agricultura natural, orgânica, biodinâmica e agroecologia In: **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte v. 22, n.212, set. /out. 2001, p. 29-39.

SARTÓRIO, M.L.; TRINDADE, C.; RESENDE, P.; MACHADO, J.R. **Cultivo orgânico de plantas medicinais**. Ed.Aprenda Fácil, 2000, 258p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide. version 6.12. Cary, 1998. 842 p.

SCHEFFER, M. C.; CORREA JR., C. Complexidade das plantas medicinais, aromáticas e condimentares: enfoque agrônomo In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná** – Diagnóstico e Perspectivas Curitiba: Sociedade Paranaense de Plantas Medicinais: EMATER – PR: EMBRAPA – Florestas, 2004, p. 9-23.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002. Acesso em 21/12/2007. Disponível em: www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaisconservacao.pdf

SEGHESE, M. A. **Projeto Vida no Campo** Vale do Ribeira – Sete Barras: São Paulo, 2006, 206p.

SILVA, M. C., VARZEA, V., GUERRA-GUIMARAES, L. et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.

SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. & BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p.189-196, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. p. 394-412.

SKARIA, B. P.; JOY, P. P.; MATHEW, S.; MATHEW, G. Lemongrass In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**, Cornwall: CRC Press, v.03, 2006, p. 400-416.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de Horticultura Orgânica** Viçosa: Aprenda Fácil, 2ªed., 2006, 843p.

SOUZA, R. M. ; MATOS, J. K. A. ; KARL, A. C. . Avaliacao preliminar da reacao de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 209-211, 1995.

SOUZA, R. R. S. **Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem** 2008, 104f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) - UNESP – FCA Faculdade Ciências Agrônômicas. Botucatu, 2008.

SOUZA, T. M.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; RANGEL, V. L. B. I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 1, p. 36-38, 2005.

STANGARLIN, J. R. Uso de extratos e óleos essenciais no controle de doenças de plantas - **Fitopatologia Brasileira**, Maringá, v. 32 suplemento, ago 2007, p. s94– s96.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 719p.

TUBELIS, A.; SALIBE, A.A. Relações entre a produção de laranja Hamlin e as precipitações mensais no altiplano de Botucatu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.7, p.801-806, jul. 1989.

URBEN, A. F.; MATTOS, J. K.; MENDES, M. A. S. Fungos associados a manchas em folhas em plantas de uso medicinal no Distrito Federal, 1987. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1987. v. 4. p. 390-394.

VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M.; MOLLE, L. Climatic and geographical aspects of medicinal plant constituents In: WIJESEKERA, R. O. B. **The medicinal plant industry**, CRC Press: Boca Raton, 1991, p. 59 – 84.

VIDA, J. B.; CARVALHO JUNIOR, A. A.; VERZIGNASSI, J. R. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 89-91, 2006.

WILSON, C. L.; SOLAR, J.M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils of antifungal activity against *Botrytis cinerea* **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.2, p. 204-210, 1997.

ZAMBOLIM, L.; CONCEIÇÃO, M. Z.; SANTIAGO, T. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**, Viçosa: UFV/DPF, 3ª ed., 2008, 464p.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JUNIOR, D.; CARVALHO, S. A. Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em limoeiro ‘cravo’, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 529-533, Dez. 2004.

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JÚNIOR, D; CARVALHO, S. A. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do portaenxerto limoeiro 'cravo' em ambiente protegido, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 508-512, dezembro 2003.