

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

CARLOS GUILHERME DOS SANTOS RUSSIANO

**VOLATILIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Fusarium*
oxysporum EM SEMENTES DE TOMATE CEREJA**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2020

CARLOS GUILHERME DOS SANTOS RUSSIANO

VOLATILIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* EM SEMENTES DE TOMATE CEREJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro

DOIS VIZINHOS

2020

R969v Russiano, Carlos Guilherme dos Santos.
Volatilidade de óleos essenciais no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de tomate cereja. / Carlos Guilherme dos Santos Russiano – Dois Vizinhos, 2020.
56 f.: il. color., 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes.
Coorientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Tomate. 3. Germinação. 4. Sementes. 5. *Fusarium oxysporum*. I. Moraes, Pedro Valério Dutra de, orient. II. Mazaro, Sergio Miguel, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

CDD: 661.806



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
**Programa de Pós-Graduação em
Agroecossistemas**



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 45

**Volatilidade de óleos essenciais no controle de *Fusarium oxysporum* em
sementes de tomate cereja**

Por

CARLOS GUILHERME DOS SANTOS RUSSIANO

Dissertação apresentada às quatorze horas e trinta minutos do dia nove de março de dois mil e vinte, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM **CIÊNCIAS AGRÁRIAS**, Linha de **Pesquisa** – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Claudia Manteli
UNISEP/Dois Vizinhos

Prof. Dra. Lilian de Souza Vismara
UTFPR/Dois Vizinhos

Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes
UTFPR/Dois Vizinhos
Orientador

Prof. Dr. Paulo Fernando Adami
Coordenador do PPGSIS

“O Termo de Aprovação, devidamente assinado, encontra-se arquivado na Coordenação do PPGSIS, conforme Norma aprovada pelo Colegiado do Programa.”

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, à minha esposa, e aos meus orientadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido este privilégio de mais uma etapa importante em minha vida, a qual me deu forças, ânimo, cuidados e bênçãos, me guiando passo a passo nesta trajetória.

Sou grato aos meus pais pela sabedoria que tiveram para me ensinar nos caminhos corretos, escolhendo sempre ser uma pessoa honesta e dedicada às pessoas e ao que fomos desempenhar em nossa vida, sempre demonstrando o seu carinho, afeto e preocupação, pois eu sei que sem a ajuda deles também não conseguiria enfrentar e chegar onde cheguei até o momento, sou muito grato a eles e muito feliz por Deus ter me concedido eles como meus pais, e poder dizer que os amo muito.

Agradeço também a minha querida esposa a qual me ajuda e ajudou muito todos os dias neste mestrado, me dando esperança com palavras de ânimo, cuidado, alguns puxões de orelha e muita compreensão, sendo em minha vida de importância inigualável, pois eu sei que se eu não tivesse ela ao meu lado, hoje eu não estaria aqui, pois ela possui muita capacidade e talento, só tenho a agradecer e dizer eu te amo.

Agradeço muito ao meu orientador Pedro Valério Dutra de Moraes e ao meu coorientador Sérgio Miguel Mazaro pela grande ajuda que me deram neste período, pela paciência, orientação e ao voto de confiança que tiveram em mim, serei eternamente grato a eles por esta grande ajuda.

“O pessimista reclama do vento, o otimista espera que ele mude, o sábio ajusta as velas.” John Maxwell.

RUSSIANO, Carlos Guilherme dos Santos. Volatilidade de óleos essenciais no controle de *Fusarium oxysporum* em sementes de tomate cereja. 2020. 53 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

RESUMO

Fusarium oxysporum é o agente causador da murcha de *Fusarium* em tomateiro, uma das formas de controle da doença é através do tratamento químico de sementes, porém o presente trabalho busca uma solução alternativa ao tratamento químico, utilizando a técnica de expurgo com óleos essenciais. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito do expurgo com óleos essenciais de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca anis e alfavaca cravo em sementes de tomate cereja contaminados com *Fusarium oxysporum*. Os experimentos foram realizados na UTFPR, *campus* Dois Vizinhos, nos laboratórios de fitopatologia e laboratório de sementes. Utilizou-se sementes orgânicas de tomate cereja, lote 118074-001-52 da ISLA. Em todos os experimentos foram utilizados o delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições. Após contato das sementes com o inóculo em placas de Petri por um período de 24 horas, seguido por expurgo das mesmas com os óleos essenciais, foi feito o teste de germinação em gerbox com 25 sementes em cada unidade experimental, por um período de 8 dias, verificando as variáveis IVG, %G, TMG. Com as mesmas sementes, o crescimento micelial foi avaliado, a fim de verificar sua influência na morfologia do fitopatógeno, para isso, uma semente de cada tratamento foi disposta no centro de uma placa de Petri, onde foi medido o crescimento micelial; e em seguida amostras de cada tratamento foram observadas em microscópio eletrônico de varredura. Após constatar o melhor tratamento, por meio dos resultados obtidos, o óleo de melaleuca foi submetido novamente ao teste de germinação, onde 25 sementes de cada tratamento composto pelas sementes de tomate cereja em contato com o patógeno nas placas de petri por 24 horas e expurgadas por mais 24 horas com óleo essencial de melaleuca em cadinhos fechados; mais a testemunha positiva em que foram usadas sementes isentas de inóculo, e a testemunha negativa, contendo apenas as sementes com o inóculo de *F. oxysporum*; em que de três em três dias quatro gerbox de cada tratamento eram abertos para verificar a porcentagem de germinação das sementes, número de sementes anormais e porcentagem de presença de micélio nas sementes, e em seguida coletadas em sacos plásticos e levadas ao congelador para posteriormente proceder os testes de indução de resistência nas plântulas, por meio da análise de quitinase, glucanase e proteínas totais. Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste de Tukey ($P \leq 0,05$), e a análise de regressão, através da ferramenta computacional Genes. Os dados finais mostraram que o óleo de melaleuca pode inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum*, sem prejudicar a germinação das sementes de tomate cereja. Os testes subsequentes com este óleo, também demonstram que com o óleo há a redução de micélio nas sementes e redução de plântulas anormais em comparação com a testemunha negativa. Não ocorreu diferença significativa entre as variáveis testadas para indução de resistência.

Palavras-chave: *Fusarium oxysporum*, expurgo, indução de resistência, germinação.

RUSSIANO, Carlos Guilherme dos Santos. Volatility of essential oils in the control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato seeds. 2020. 53 f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2020.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum is the causative agent of Fusarium wilt in tomato, one of the ways to control the disease is through chemical treatment of seeds, however the present work seeks an alternative solution to chemical treatment, using the purging technique with essential oils. The objective of the work is to evaluate the effect of purge with essential oils of tea tree, chia, citronella, lavender, anise and clove lavender in cherry tomato seeds contaminated with *Fusarium oxysporum*. The experiments were carried out at UTFPR, Dois Vizinhos campus, in the phytopathology and seed laboratories. Organic cherry tomato seeds, batch 118074-001-52 from ISLA were used. In all experiments, a completely randomized design with four replications was used. After contact of the seeds with the inoculum in Petri dishes for a period of 24 hours, followed by purging them with essential oils, the gerbox germination test was performed with 25 seeds in each experimental unit, for a period of 8 days, checking the variables IVG, % G, TMG. With the same seeds, mycelial growth was evaluated, in order to verify its influence on the phytopathogen morphology, for this, a seed from each treatment was placed in the center of a Petri dish, where mycelial growth was measured; and then samples of each treatment were observed in a scanning electron microscope. After confirming the best treatment, through the results obtained, tea tree oil was again submitted to the germination test, where 25 seeds of each treatment composed of the cherry tomato seeds in contact with the pathogen in the petri dishes for 24 hours and purged for another 24 hours with tea tree essential oil in closed crucibles; plus the positive control in which seeds without inoculum were used, and the negative control, containing only the seeds with the inoculum of *F. oxysporum*; in which every three days four gerboxes from each treatment were opened to check the percentage of germination of the seeds, number of abnormal seeds and percentage of presence of mycelium in the seeds, and then collected in plastic bags and taken to the freezer to later proceed the resistance induction tests in seedlings, through the analysis of chitinase, glucanase and total proteins. The results obtained were submitted to the Tukey test ($P \leq 0.05$), and the regression analysis, through the computational tool Genes. The final data showed that tea tree oil can inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum*, without harming the germination of cherry tomato seeds. Subsequent tests with this oil also demonstrate that with the oil there is a reduction of mycelium in the seeds and a reduction of abnormal seedlings in comparison with the negative control. There was no significant difference between the variables tested for resistance induction.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, purge, resistance induction, germination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** – Cadinhos contendo o óleo essencial sobre o papel filme na tampa, para realizar o expurgo nas sementes de tomate cereja com o inóculo de *F. oxysporum*.....29
- Figura 02** – Disposição das sementes nos gerbox expurgadas com cada tratamento; e em seguida acondicionadas em germinador.....30
- Figura 03** – Tratamentos disposto em placas de Petri®.....31
- Figura 04** – Unidade experimental composta pelo gerbox contendo as sementes e plântulas do teste de germinação.....32
- Figura 05** – Crescimento micelial (cm) de oito níveis de tratamentos (Test +, Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo e Test -) em função de seis tempos de análise (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, campus Dois Vizinhos-PR, 2019.....37
- Figura 06** – Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* às 144 horas, nos tratamentos contendo a testemunha com inóculo, testemunha sem inóculo, e óleo de melaleuca.....38
- Figura 07** – Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* às 144 horas, nos tratamentos contendo a testemunha com inóculo, óleo de melaleuca e óleo de chia.....39
- Figura 08** - Hifas do tratamento testemunha com inóculo de *F. oxysporum* aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....40
- Figura 09** - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de chia aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....41
- Figura 10** - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de citronela aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....41
- Figura 11** - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de lavanda aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....42
- Figura 12** - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de alfavaca anis aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....42
- Figura 13** - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de alfavaca cravo aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).....43
- Figura 14** – Germinação, em % em função de quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12 dias) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, campus Dois Vizinhos-PR, 2019.....44
- Figura 15** – Plântulas anormais (%) de três níveis de tratamentos (teste, óleo de melaleuca e *Fusarium oxysporum*) em função de quatro tempos de análise (24, 48, 72 e 96 horas) de um experimento bifatorial, conduzido no

	delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, <i>campus</i> Dois Vizinhos-PR, 2020.....	44
Figura 16	– Porcentagem de micélio de <i>F.oxysporum</i> na semente (%) em função três níveis de tratamentos (teste, óleo e <i>Fusarium</i> sp.) versus quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12), conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, <i>campus</i> Dois Vizinhos-PR, 2019.....	45
Figura 17	– Teor de proteínas em função três níveis de tratamentos (teste, óleo e <i>Fusarium</i> sp.) versus quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12), conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, <i>campus</i> Dois Vizinhos-PR, 2019.....	47
Figura 18	– Teor de glucanase em função de quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12 dias) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, <i>campus</i> Dois Vizinhos-PR, 2019.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Tempo médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG) e Porcentagem de germinação (G%), de plântulas de tomate inoculadas com *Fusarium oxysporum* e expurgadas com óleos essenciais de Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo, e Testemunha com Água Deionizada e Testemunha contendo *Fusarium oxysporum*. Dois Vizinhos-PR, UTFPR, 2020.....34
- Tabela 02** – Graus de liberdade (GL) e quadrados médios da análise de variância para as variáveis germinação (%), plântulas anormais (%), teor de proteínas, glucanase, quitinase, porcentagem de micélio na semente (%) e crescimento micelial (cm) de um experimento bifatorial conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, campus Dois Vizinhos-PR, 2019.....36
- Tabela 03** – Média de Crescimento micelial (cm) em função oito níveis de tratamentos (Test +, Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo e Test -) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, *campus* Dois Vizinhos-PR, 2019.....38
- Tabela 04** - Média de Plântulas anormais (%) em função três níveis de tratamentos (Teste, óleo e *Fusarium*) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, campus Dois Vizinhos-PR, 2019.....45

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
PR	Paraná
IVG	Índice de velocidade de Germinação
TMG	Tempo médio de Germinação
%G	Porcentagem de Germinação
PPGSIS	Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas
°C	Unidade de medição de temperatura, graus célsius
µL	Unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro, microlitro
mL	Unidade de volume
L	Unidade de volume, litro
mm	Unidade de medida, milímetros
cm	Unidade de medida, centímetros
kg/ha	Unidade de medida em rendimento, quilograma por hectare
kg	Unidade de grandeza em massa, quilogramas
g	Unidade de massa, gramas
BDA	Meio de cultivo, batata dextrose e ágar
BD	Meio de cultivo, batata e dextrose
+	Soma
%	Porcentagem
®	Marca registrada
BOD	Estufa incubadora Demanda Química do Oxigênio
ANOVA	Análise de Variância
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CIM	Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO.....	18
1.1.1 Geral.....	18
1.1.2 Específicos.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	20
2.1 CULTURA DO TOMATEIRO.....	20
2.1.1 Taxonomia e descrição botânica.....	20
2.1.2 Origem do tomate.....	21
2.1.3 Tomate cereja.....	21
2.1.4 Extração de sementes.....	22
2.1.5 Germinação.....	23
2.1.6 Murcha de <i>Fusarium</i> em tomateiro.....	23
2.2 EXPURGO DE SEMENTES.....	24
2.3.1 Importância dos óleos essenciais no controle de doenças em plantas.....	25
2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 EXPURGO DAS SEMENTES DE TOMATE CEREJA COM ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
3.2 TESTE DE GERMINAÇÃO.....	29
3.3 CRESCIMENTO MICELIAL.....	30
3.4 TESTE DE GERMINAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA.....	32
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA QUITINASE E B-1,3-GLUCANASE.....	33
3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES EXPURGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL.....	34
4.2 CRESCIMENTO MICELIAL.....	35
4.3 GERMINAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA.....	43
4.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE RESISTÊNCIA.....	46
5 CONCLUSÃO	49

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS:.....	51

1. INTRODUÇÃO

A família *Solanaceae* é considerada de grande importância na agricultura, pois são encontradas as mais variáveis espécies produtoras de alimentos, plantas medicinais e plantas daninhas. Tendo presente cerca de 96 gêneros e 2300 espécies (MINAMI; MELLO, 2017).

Uma destas espécies é o tomateiro *Solanum lycopersicum*, o qual merece destaque em praticamente todos os continentes, o Brasil está em 9º colocado na produção mundial de tomate, ranking liderado pela China, seguida dos Estados Unidos e Turquia (CARVALHO, PAGLIUCA, 2007). Foi trazida ao Brasil pelos italianos no fim do século de XIX; no século XX o país já importava o extrato de tomate da Itália e da Argentina (MINAMI; MELLO, 2017).

Existem várias espécies de tomate cultivadas no Brasil, porém o cultivo do tomate cereja iniciou em 1990 (FILGUEIRA, 2008). Por ser um tomate de tamanho pequeno, é mais utilizado em saladas (PENTEADO, 2004).

Vários são os gargalos que afetam o cultivo do tomateiro, sendo pragas, plantas daninhas e doenças. Entre as doenças que mais afetam a cultura do tomateiro e cuja disseminação ocorre via sementes, está a murcha de *Fusarium*, ocasionada por *Fusarium oxysporum*. Os sintomas podem aparecer em qualquer estágio da cultura, sendo seu principal sintoma a murcha das folhas superiores nos horários com maior temperatura do dia (SILVA, BETTIOL, 2006). Inóculos do fitopatógeno podem ficar no solo ou nos restos culturais por meio de clamidósporos, permanecendo por um período maior que cinco anos (ZAMBOLIM; RIBEIRO do VALE; COSTA; 2000).

Tendo em vista a problemática envolvendo produtos e tratamentos químicos, tem-se buscado cada vez mais por formas de controle alternativas, reduzindo riscos à saúde humana e vegetal. Os óleos essenciais têm se tornado uma forma viável de controle antimicrobiano, como visto em trabalho realizado por Cruz *et al.* (2013), onde óleos essenciais de *Allium sativum*, *Copaifera langsdorfii*, *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum zeylanicum* controlaram Antracnose nos frutos de banana.

Deste modo, o trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito do expurgo por volatilização dos óleos essenciais de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca anis

e alfavaca cravo em sementes orgânicas de tomate cereja contaminados com *Fusarium oxysporum*.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Geral

Utilizar a técnica de expurgo por volatilização dos óleos essenciais de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca anis e alfavaca cravo para reduzir contaminação de lotes de sementes de tomate com inóculo de *Fusarium oxysporum*, causador da murcha de *Fusarium* em tomate cereja. Com vistas a possibilitar a utilização desta técnica na produção orgânica de sementes de tomate, obtendo como vantagem a pequena quantidade de óleo utilizado, visto seu alto custo de mercado.

1.1.2 Específicos

- Realizar o expurgo das sementes de tomate cereja com óleo essencial de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca anis e alfavaca cravo; e, assim, selecionar o óleo que apresentar melhor potencial no controle fitossanitário;
- Avaliar o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* após o expurgo;
- Observar a morfologia das hifas de *Fusarium oxysporum* após expurgo com os óleos;
- Verificar se há a indução de resistência nas plântulas de tomate após tratamento das sementes com óleo de melaleuca;

- Avaliar a germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação, além da presença de micélio e plantas anormais de sementes de tomate expurgadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 CULTURA DO TOMATEIRO

2.1.1 Taxonomia e descrição botânica

O tomateiro é uma planta dicotiledônea, da família *Solanaceae* e gênero *Lycopersicon*. Sendo presente taxonomicamente no Reino Vegetal nas seguintes características (ARMIJOS JARAMILLO *et al.*, 2007):

- Reino Plantae;
- Sub-reino Tracheibionta;
- Divisão Magnoliophyta;
- Classe Magnoliopsida;
- Subclasse Asteridae;
- Ordem Solanales;
- Família Solanaceae;
- Gênero *Lycopersion* (*Solanum*);
- Espécie *esculentum* (*Lycopersicum*).

A família *Solanaceae* é considerada de grande importância na agricultura, pois são encontradas as mais variáveis espécies produtoras de alimentos, plantas medicinais e plantas daninhas. Tendo presente cerca de 96 gêneros e 2300 espécies (MINAMI; MELLO, 2017).

Seu fruto é caracterizado como uma baga carnosa variando da cor vermelha ao amarelo, sendo encontrado frutos de diversos tamanhos, de 1,5 cm a 10 cm de diâmetro. Já os tomates cereja são pequenos em relação aos tomates de mesa, os quais possuem superfície lisa ou rugosa. Apresentam-se em formato globoso, podendo ser em formatos de ameixa ou pêra. Apresenta cerca 90% de água em seus frutos, com baixo teor de gorduras e proteínas, com aproximadamente 3% de carboidratos, minerais, vitaminas C, E, complexo B e caroteno (BARBIERI; STUMPF, 2008).

Segundo Clemente e Boiteux (2012) a coloração vermelha do fruto, é devido

a presença de licopeno, pigmento encontrado dentro da polpa do fruto. O fruto possui divisões em lóculos, com a presença de sementes em seu interior na mucilagem placentária.

O número de sementes por fruto ocorre em diferentes quantidades, tudo isso devido ao modo de cultivo, podendo chegar a mais de 200 sementes por fruto. O peso de 1000 sementes oscila de 2,5 a 3,5 g. Existem alguns genótipos partenocárpicos, esses são aqueles que não produzem sementes, presentes em genes recessivos (CLEMENTE; BOITEUX, 2012).

2.1.2 Origem do tomate

O centro de origem do tomateiro, fica restrito ao Centro Sul-Americano (Peru – Equador – Bolívia), sendo mais preciso na região norte do Chile, Equador e litoral do Pacífico, com aproximadamente uma altitude de 2000 metros nos Andes, e possivelmente nas Ilhas de Galápagos e no Oceano Pacífico (MINAMI; MELLO, 2017).

Foi da espécie cultivada *Solanum lycopersicum* que se deu a origem a espécie silvestre andina *Solanum cerasiforme*, os quais produzem frutos tipo cereja (PEREIRA, STUMPF, BARBIERI, 2008).

Por volta do fim do século de XIX os primeiros imigrantes italianos trouxeram ao Brasil, o hábito de comer tomate. Por volta do início do século XX já ocorria a importação de extrato de tomate da Itália e Argentina ao Brasil (MINAMI; MELLO, 2017).

Em meados de 1916 ocorre a fundação da companhia Carlos de Brito, que então criaram a marca peixe, sendo a primeira a produzir extratos de tomate em 1920. Os primeiros pequenos cultivos de tomate no Brasil foram nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro (MINAMI; MELLO, 2017).

2.1.3 Tomate cereja

O tomate cereja teve seu cultivo iniciado no começo do ano de 1990, tratando-se de um grupo de cultivar para mesa. É caracterizado por ter frutos pequenos, entre 15 - 25 g; com coloração vermelha, com suave toque do sabor de cereja. Possuindo

culturas altamente produtivas devido seu excelente sistema híbrido, se desenvolvendo em pencas, contendo de 20 - 40 frutos (FILGUEIRA, 2008).

Por ser um tomate diminuto em tamanho, é mais utilizado e consumido em saladas. Para a obtenção das sementes ocorre um processo de seleção pelos próprios agricultores, destacando-se as cultivares: Mini Carol e Pepe, já para o processo de cultivo orgânico, destaca-se o Roqueso (PENTEADO, 2004).

Geralmente, os frutos possuem formato globular, mas por meados de 2005, surgiu no mercado o tomate cereja alongado, com comercialização na forma de pencas, usados em São Paulo e na Europa. O seu crescimento é indeterminado sendo orientado no seu cultivo o uso adicional de estacas quando seu plantio for a campo ou casa de vegetação (FILGUEIRA, 2008).

2.1.4 Extração de sementes

Antes do processo de extração do fruto, este pode ser lavado ou não. Porém precisam ficar alguns dias armazenados em galpão ventilados e frescos, buscando chegar a maturação completa das sementes antes de sua extração. O processo de extração ocorre com o auxílio de equipamentos mecânicos (CLEMENTE; BOITEUX, 2012).

Segundo Nascimento (2004), o processo de extração de semente de tomate pode ocorrer de forma industrial, com o auxílio de equipamentos extratores ou em forma de pequeno produtor/escala, o qual pode ocorrer de forma manual retirando a semente do fruto com um corte não muito profundo no meio.

Existem várias formas de fazer a extração de sementes, uma delas seria o método de lavagem imediato; o outro, o de fermentação. Neste último, faz-se a remoção das mucilagens da semente do tomate, mas tendo um leve prejuízo em sua aparência para posterior comercialização. Entretanto existe também o processo por remoção química sendo este de maior vantagem por ser mais rápido e econômico, deixando suas sementes de bom aspecto (MINAMI; MELLO, 2017).

2.1.5 Germinação

Um dos fatores que devem ser levados em consideração quanto ao processo de germinação do tomate é a luz. Sementes de tomate germinam melhor em ambientes com ausência de luz. O poder germinativo da semente de tomate dura de 3 a 4 anos podendo variar em até 10 - 12 anos se bem armazenadas (MINAMI; MELLO, 2017).

Quanto ao tamanho ideal da semente para se obter uma ótima germinação, desenvolvimento do fruto. Bem como a produção, prefere-se sementes pequenas, pois possuem a capacidade de germinar em menor tempo, enquanto sementes de porte maior demoram maior tempo para germinarem, havendo uma relação negativa entre o tamanho das sementes a sua germinação (MINAMI; MELLO, 2017).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), a temperatura ideal de germinação pode variar com uma temperatura de 20 °C em um período de 16 horas (h) a 30 °C durante 8 horas.

O processo de germinação da semente de tomate ocorre em três principais etapas. A primeira fase possui um destaque na capacidade de absorção de água pela semente, podendo ocorrer em um período de 9 – 12 h; No segundo estágio ocorre o repouso, onde não é percebido nenhuma alteração na atividade fisiológica ou anatômica da plântula, porém os cotilédones continuam sendo hidratados e ativando enzimas presentes, este período perdura num total de 40 h; E no terceiro e último período é onde ocorre novamente a absorção de água e o começo da divisão celular que ocorre nas 56 h após a embebição, devido ao desenvolvimento da radícula após 72 h de embebição (MINAMI; MELLO, 2017).

2.1.6 Murcha de *Fusarium* em tomateiro

Fusarium oxisporum sp. é um fungo deuteromiceto capaz de produzir macroconídeos hialinos, alantoides, com 2 a 4 septos, de paredes finas com microconídeos hialinos com uma ou duas células. Produzindo os clamidósporos com parede lisa e espessa, que podem persistir ao solo por mais de 10 anos. A penetração do fungo ocorre nas raízes por meio dos pelos absorventes ou ferimentos, assim colonizando o sistema vascular das plantas, atingindo os frutos e as sementes

(KIMATI; et Al; 1997).

A disseminação ocorre pela água, implementos agrícolas, sementes, mudas e vento que levam este patógeno de uma área a outra podendo contaminar vários locais. Começa ocorrer o agravamento dos sintomas quando a planta se desenvolve em local com pouca presença de cálcio, ácidos e água (ZAMBOLIM; RIBEIRO do VALE; COSTA; 2000).

Quando ocorre a ausência de hospedeiro, este pode ficar ao solo ou nos restos culturais em formato de clamidósporos, sendo que nesta forma o fungo pode ficar por um período maior que cinco anos (ZAMBOLIM; RIBEIRO do VALE; COSTA; 2000). A temperatura ótima para ocorrer o ataque do fungo varia de 21 a 33 °C, sendo 28 °C como uma excelente temperatura (ZAMBOLIM; RIBEIRO do VALE; COSTA; 2000).

Em qualquer etapa do desenvolvimento da planta pode desencadear a doença, mas sendo mais comum no período de iniciação floral e frutificação. Apresenta como sintomas o amarelecimento de folhas velhas, ocorrendo a transmissão para as folhas jovens. O ocorrido pode ser visível em um lado ou na metade da folha. Apresentando folíolos amarelos, murchos, secos e vasos lenhosos das folhas e caule apresentam coloração parda. Os frutos não se desenvolvem ocorrendo queda prematura com descoloração dos vasos (KIMATI; et al; 1997).

Segundo Kimat *et al.* (2005), existe apenas um único método de controle a este fungo, sendo uso de variedades resistentes, mas com ressalva de ajuda de outras medidas como a rotação de cultura por um período de 3 a 5 anos, e o tratamento de sementes com benomyl, tiofanato metílico ou tiabendazole. Porém, aos tomates de estaca recomenda-se o plantio de variedades resistentes a raça 1 como a Ângela Santa Clara. Já na variedade tipo caqui as que apresentam resistência a raça 1 é destacado a Carmem, Momotaro, Fanny, etc. Já em casos de tomate rasteiro, na indústria todas as variedades são resistentes a raça 1 (KIMATI et al; 2005).

2.2 EXPURGO DE SEMENTES

O expurgo é empregado quando há infestação de pragas ou doenças em

grãos armazenados. Muito comum em silos e armazéns, é feito em locais vedados (armazéns, silos, câmaras de expurgo, porões de navios) sem passagem de ar, antes de utilizar o produto para o expurgo, e este produto deve ser aplicado em uma dose letal para o agente (LORINI *et al.* 2015).

A fosfina é comumente empregada no expurgo de grãos armazenados, todavia o uso demasiado em doses erradas, tem trazido problemas de resistência, bem como de intoxicação humana (ALMEIDA *et al.* 2005). A fosfina é altamente tóxica e controla pragas em todas as fases de ovo, larva, pupa e adulto (LORINI *et al.* 2013).

2.3 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais podem ser extraídos via hidrodestilação, arraste a vapor d'água, enfloração, extração por CO₂ ou através de solventes orgânicos apolares. Estes óleos apresentam-se em forma oleosa e volátil em temperatura ambiente (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários das plantas, e se diferenciam dos primários por se apresentarem na natureza em menor número de espécies. Possuem este nome por serem produtos derivados do metabolismo secundário, não estando diretamente ligados na manutenção vegetal (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A produção de metabólitos secundários pode atuar na defesa vegetal e sua síntese ocorre por meio de estímulos, sendo estes bióticos, como a ação de microrganismo, insetos ou plantas; e bióticos como fatores ligados a luz, temperatura e estresses hídricos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

2.3.1 Importância dos óleos essenciais no controle de doenças em plantas

A utilização de óleos essenciais vem ganhando maior destaque industrial devido sua vasta utilização nas áreas de cosmética, alimentícia, farmacêutica e de perfumaria, isto devido seus componentes de ação terapêuticos e medicinais (TRAN-COSO, 2013). Destaca-se o emprego como agente antimicrobiano, principalmente em

relação a microrganismos resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON *et al.* 1995).

Silva *et al.* (2015), demonstraram através do uso de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) e de capim limão (*Cymbopogon citratus*) uma redução na pinta bacteriana do tomateiro, além de verificarem o aumento nos fenóis totais e lignificação da parede celular, colaborando para um potencial de indução de resistência na planta.

Oligine *et al.* (2017) mostram que o óleo essencial de chia (*Salvia hispanica*) atuou no controle de *Botrytis cinerea* causador do mofo cinzento, em frutos de morango, ativando a enzima quitinase.

Soylu, kurt e Soyly (2010) observaram que o óleo essencial de lavanda (*Lavandula stoechas*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na concentração de 1,6 µg/mL de ar, inibiram completamente o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, atuando na forma volátil.

Insenberg e Nozaki (2013) viram que o óleo essencial de alfavaca (*Ocimum basilicum*) nas concentrações acima de 10 µL, inibiram o crescimento micelial de *Diplocarpon rosae* causador da pinta preta em roseiras.

Cavalcanti, Almeida e Padilha (2011) observaram que óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) através do método da concentração inibitória mínima (CIM), exerceram efeito antifúngico sobre o gênero *Candida*, agente causal da candidíase bucal em seres humanos.

Dias-Ariera *et al.* (2010) destacam o emprego do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em plantas de morango. Onde obteve-se controle do fitopatógeno com ambos os óleos *in vitro*, sendo que a campo apenas o óleo de *Azadirachta indica* reduziu abortamento floral.

Também há destaque no emprego do óleo essencial via volatilização, como o trabalho realizado por Elizei *et al.* (2016), onde o uso do óleo essencial de café-verde reduziu a esporulação e crescimento micelial de *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer* tanto em contato direto, quanto via volatilização.

É muito importante que o composto majoritário do óleo essencial utilizado seja identificado, com vistas a dar reprodutibilidade nos resultados, bem como entender o mecanismo envolvido. Além de que, estes óleos essenciais possuem grandes perspectivas no controle de doenças em plantas, pois adquirem vantagem em ser

pouco ou nada fitotóxicos, e caracterizar-se pela rápida degradação, sendo em sua maioria sistêmicos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

A planta quando levada ao estado de indução, ocorre uma síntese de compostos químicos, através da ativação dos genes de resistência. A indução de resistência pode ser mensurada, por exemplo, pelo aumento da atividade de enzimas como quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases e peroxidases (BETTIOL, MORANDI, 2009).

A indução pode ocorrer por meio de dois caminhos: a resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (RSA). Para o indutor ser SAR, nem compostos ou metabólitos podem ter ação microbiana *in vitro* ou *in vivo*. Ou seja, o composto deve modificar a natureza da interação patógeno-planta; e deve ser capaz de proteger a planta contra patógenos (ROMEIRO, 2007).

Na SAR se tem o acúmulo de proteínas relacionadas com patogênese (PRPs) como mecanismo de defesa, induzida por salicilato dependente, promovendo alterações visuais. Na ISR não ocorre acúmulo de PRPs, nem alterações visuais na planta, o eliciador é um microrganismo não-patogênico e a rota de sinalização está associada a jasminatos e etileno (BETTIOL; MORANDI, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPURGO DAS SEMENTES DE TOMATE CEREJA COM ÓLEOS ESSENCIAIS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de fitossanidade e no laboratório de sementes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. Utilizou-se sementes orgânicas de tomate cereja, lote118074-001-52 da ISLA.

Os óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), chia (*Salvia hispanica*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), lavanda (*Lavandula stoechas*), alfavaca anis (*Ocimum selloi*) e alfavaca cravo (*Ocimum gratissimum*) foram obtidos de forma comercial.

Como fitopatógeno desafiante utilizou-se *Fusarium oxysporum*, causador da murcha de *Fusarium* em tomateiro. Este fitopatógeno foi isolado e repicado em placas de Petri® contendo meio BDA e acondicionados em BOD à 25 °C, até se obter colônia pura. O meio BDA foi composto por 27 g de meio BD comercial (batata e dextrose), adicionando mais 10 g de ágar para solidificar.

As sementes de tomate cereja utilizadas foram desinfestadas em um Becker utilizando hipoclorito de sódio a 5% por 15 minutos, posteriormente lavadas com água deionizada conforme RAS (BRASIL, 2009), sendo que todo procedimento ocorreu em câmara de fluxo laminar.

Em três placas de Petri® contendo meio BDA com a cultura pura e esporulada, com crescimento médio de 10 dias, transferiu-se 296 sementes de tomate cereja em cada placa. Essas foram isoladas com papel filme de PVC para fechar as placas evitando contaminação externa, e estas mantidas em BOD por um período de 24 horas, a fim de que os esporos do *F. oxysporum* se aderissem às paredes das sementes de tomate cereja.

Passado este período, cadinhos de alumínio foram higienizados com álcool 70%, e na tampa de cada um foi aderido papel filtro, onde foi transferido com auxílio de um pipetador automático 20 uL dos tratamentos: água (testemunha positiva e negativa) e os óleos essenciais de: melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca anis,

alfavaca cravo, compondo os tratamentos. Para cada cadinho transferiu-se 110 sementes de tomate cereja que estavam nas placas de Petri® no período de 24 h (figura 01).

Figura 01 – Cadinhos contendo o óleo essencial sobre o papel filme na tampa, para realizar o expurgo nas sementes de tomate cereja com o inóculo de *F. oxysporum*.



Fonte: O autor (2020).

Os cadinhos foram fechados com papel filme de PVC, e deixados em expurgo por um período de 24 horas.

3.2 TESTE DE GERMINAÇÃO

Para o teste de germinação, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, contendo sete tratamentos sendo utilizadas as sementes expurgadas e descritas no item 3.1, compondo os tratamentos com água destilada para a testemunha positiva, isenta do inóculo do patógeno; e água destilada para a testemunha negativa, mais o inóculo do patógeno; óleo de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca aniz, e alfavaca cravo. Cada unidade experimental foi composta por um gerbox com 25 sementes de tomate cereja distribuídas sobre papel Germitest, umedecidos com 2,5 vezes o peso do papel RAS (BRASIL, 2009) com água deionizada. Os gerbox foram acondicionados em germinador à 25 °C com

ausência de luz, por um período de oito dias (Figura 02).

Figura 02 – Disposição das sementes nos gerbox expurgadas com cada tratamento; e em seguida acondicionadas em germinador.



Fonte: O autor (2020).

As avaliações foram realizadas diariamente por um período de oito dias, considerando-se sementes germinadas aquelas que apresentavam protrusão radicular acima de 2mm. As variáveis analisadas foram percentagem de emergência (%), segundo as normas propostas pela RAS (Brasil,2009); Índice de velocidade de emergência (IVE) de acordo com a metodologia proposta por Maguire (1962), calculado pela fórmula $IVG = \sum (ni/ti)$, sendo ni = número de sementes que germinaram em cada dia e ti = dia em que a semente germinou; (TMG), de acordo com Silva e Nakagawa (1995), calculado pela fórmula $TMG = (\sum ni ti) / \sum ni$, sendo ni = número de sementes germinadas por dia e ti = dia em que a semente germinou.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors, não havendo a necessidade de transformação. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$), através Da ferramenta computacional Genes (CRUZ, 2016).

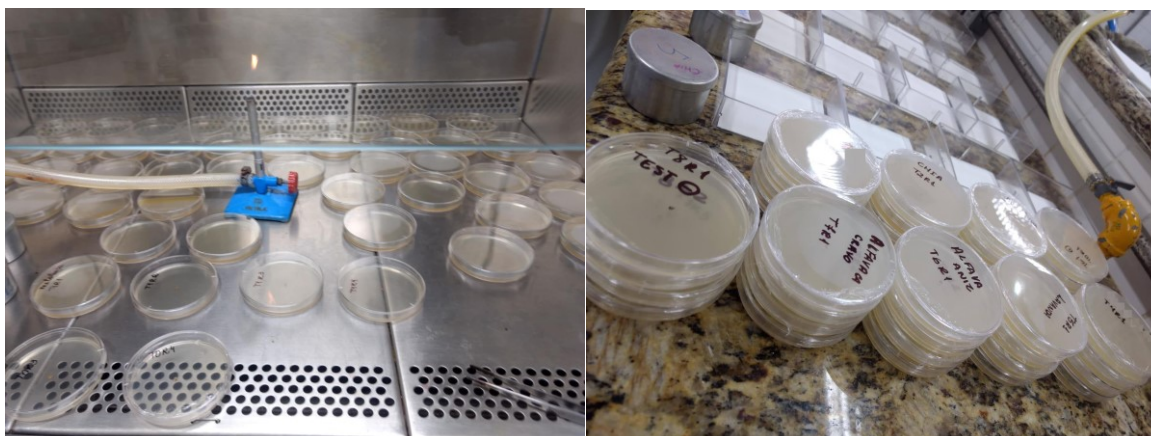
3.3 CRESCIMENTO MICELIAL

Em conjunto com o teste de germinação, foi realizado concomitantemente o ensaio de crescimento micelial, utilizando as mesmas sementes expurgadas no item

3.1. Para este experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições; utilizando os mesmos tratamentos do item 3.2, sendo eles: água destilada para a testemunha positiva, isenta do inóculo do patógeno; e água destilada para a testemunha negativa, mais o inóculo do patógeno; óleo de melaleuca, chia, citronela, lavanda, alfavaca aniz, e alfavaca cravo.

Em câmara de fluxo laminar, foi vertido nas placas de Petri® o meio BDA, e no centro de cada placa foi transferido com o auxílio de uma pinça flambada, uma semente de tomate cereja expurgada com o respectivo tratamento já citado. Depois as placas foram fechadas com filme de PVC e levadas à BOD à 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, até que algum tratamento atingisse o crescimento em toda a placa (Figura 03).

Figura 03 – Tratamentos disposto em placas de Petri®.



Fonte: O autor (2020).

O crescimento foi mensurado com o auxílio de uma régua, dividindo-se a placa na dimensão vertical e horizontal. Ao término do experimento foi realizado a microscopia eletrônica de varredura, para verificar o efeito que os óleos essenciais tiveram sobre a morfologia das hifas do *Fusarium oxysporum*.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors; acompanhado de análise de variância (ANOVA) e da análise de regressão no software Genes (CRUZ, 2016).

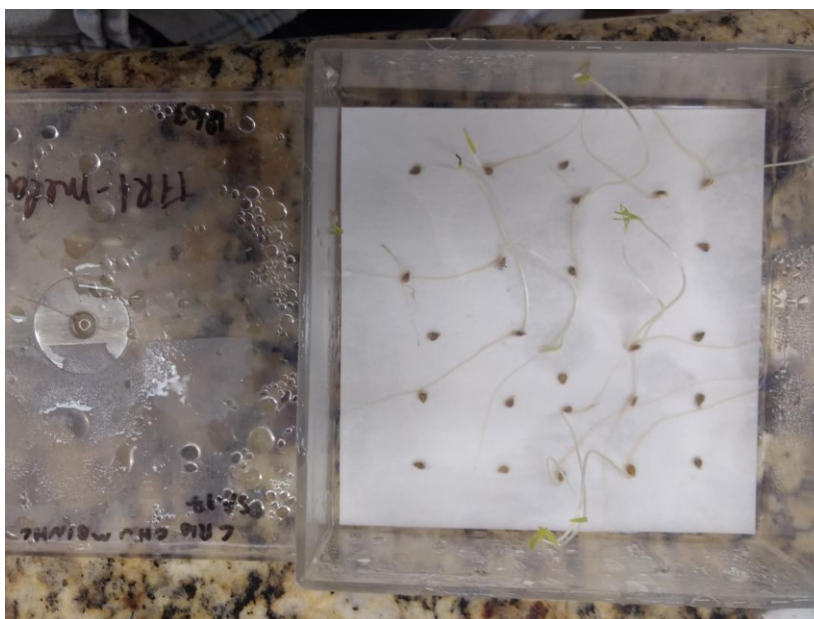
3.4 TESTE DE GERMINAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA

Obteve-se como destaque no controle de *F. oxysporum* o óleo essencial de melaleuca. Logo os demais ensaios laboratoriais foram com esse óleo. Desta forma, realizou-se novamente o expurgo das sementes de tomate cereja, conforme procedimento explicado anteriormente no item 3.1, adotando o mesmo período de 24h.

Neste experimento adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema bifatorial, sendo o tratamento quantitativo (fator A), o tempo de germinação, considerando: 3, 6, 9 e 12 dias após implantação do experimento. Já o tratamento qualitativo (fator B) foram as sementes inoculadas com *F. oxysporum* e expurgadas com óleo de melaleuca na dose de 20 uL; apenas *F. oxysporum* expurgadas com água destilada, e testemunha sem inoculação de *F. oxysporum* e expurgado com água destilada.

A cada três dias, avaliou-se: a presença de plântulas anormais e presença ou ausência de micélio sobre esta. Após todas as plântulas contidas no gerbox avaliado foram transferidas em envelopes e congelados, para posterior pesagem e realização de análises de glucanase, quitinase e proteínas (Figura 04).

Figura 04 – Unidade experimental composta pelo Gerbox contendo as sementes e plântulas do teste de germinação.



Fonte: O autor (2020).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors; acompanhado da ANOVA e da análise de regressão no software Genes (CRUZ, 2016).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA QUITINASE E B-1,3-GLUCANASE

Para quantificar as atividades de quitinase e β -1,3-glucanase as amostras foram maceradas em 2,0 mL de tampão acetato 100 mM (pH 5,0), com posterior centrifugação (20.000 g por 25 min, a -4°C). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a avaliação da atividade das enzimas. A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta.

Para determinação espectrofotométrica das atividades de β -1,3-glucanase nos extratos foi utilizado como substrato solução de carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-Curdlan-RBB 4 mg.mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por WIRTH E WOLF (1992) e com o procedimento descrito por GUZZO (1996).

3.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para dosagem de proteínas totais, as amostras de tecidos foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Posteriormente, o material foi centrifugado (14.000 g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante recolhido. Para quantificar o total de proteínas, realizou-se o teste de Bradford (1976). E leitura em espectrofotômetro, modelo UV-1601-Shimadzu à 630 nm, com soro albumina bovina como padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES EXPURGADAS COM ÓLEO ESSENCIAL

Na Tabela 01, pode-se verificar que não houve diferença significativa na porcentagem de germinação das sementes tratadas com os óleos estudados. O Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de alfavaca cravo foi o maior, seguido da testemunha com *F. oxysporum*, e chia. Já o óleo essencial de melaleuca não diferiu da testemunha positiva.

Tabela 01 - Tempo médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG) e Porcentagem de germinação (G%), de plântulas de tomate inoculadas com *Fusarium oxysporum* e expurgadas com óleos essenciais de Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo, e controle positivo (com Água Deionizada) e controle negativo (sementes infestadas com *Fusarium oxysporum*) contendo *Fusarium oxysporum*. Dois Vizinhos-PR, UTFPR, 2020.

ÓLEOS ESSENCIAIS	TMG (dias)	IVG	%G
Testemunha sem inóculo	1.73 b	28.82 c	87 a
Melaleuca	1.96 b	23.76 c	81 a
Chia	2.17 ab	52.88 ab	90 a
Citronela	2.18 ab	43.88 b	78 a
Lavanda	2.48 a	45.58 b	81 a
Alfavaca Anis	1.81 b	45.78 b	77 a
Alfavaca Cravo	1.91 b	58.37 a	93 a
Testemunha com inóculo	2.01 ab	53.79 ab	84 a
CV%	10.61	9.86	8.96

* Médias não seguidas por mesma letra, na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: O autor (2020).

Quanto ao Tempo Médio de Germinação (TMG), o óleo de lavanda foi o que obteve um maior tempo médio para a germinação, em dias, seguido dos óleos de citronela, chia, e a testemunha com *F. oxysporum*. Logo, levam mais tempo para germinar, o que é ruim, tendo em vista que o estabelecimento da planta é mais lento, fazendo com que plantas daninhas possam se estabelecer juntamente no local, competindo por água e nutrientes. A testemunha positiva (com água deionizada) obteve melhor TMG seguido pelo óleo essencial de alfavaca anis; porém, diferiu apenas do tratamento com óleo essencial de lavanda.

Lobato *et al.* (2007) verificaram em experimento envolvendo diferentes

concentrações de óleo essencial de *Piper aduncum* sobre sementes de *Vigna unguiculata*, que conforme aumentaram a concentração de óleo essencial houve redução da germinação, porém quando comparada com o controle, não houve diferença significativa, e que portanto não apresenta fitotoxicidade do óleo sobre o crescimento inicial do embrião ou de qualquer tecido que comprometa o desenvolvimento da plântula, haja visto que não difere da testemunha. É o que ocorre neste caso com o IVG, onde Melaleuca, na concentração 100% (dose de 20 uL), não difere da testemunha.

Almeida *et al.* (2019) observaram que o óleo essencial de Colônia na concentração de 1% inibe a germinação e o IVG de sementes de tomate, já o óleo de goiaba e de nim não possuíram efeito sobre a germinação de sementes de tomate. Souza *et al.* (2017) puderam observar que o óleo essencial de *Croton nepetaefolius*, exerceu efeito fitotóxico sobre sementes de tomate, inibindo completamente sua germinação.

4.2 CRESCIMENTO MICELIAL

A Tabela 02 mostra os graus de liberdade (GL) e quadrados médios da análise de variância para as variáveis germinação (%), plântulas anormais (%), teor de proteínas, glucanase, quitinase, porcentagem de micélio na semente (%) e diâmetro médio do crescimento micelial (cm).

Tabela 02 – Graus de liberdade (GL) e quadrados médios da análise de variância para as variáveis germinação (%), plântulas anormais (%), teor de proteínas, glucanase, quitinase, porcentagem de micélio na semente (%) e crescimento micelial (cm) de um experimento bifatorial inteiramente ao acaso tratados com 20 uL de óleo essencial de melaleuca. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2019.

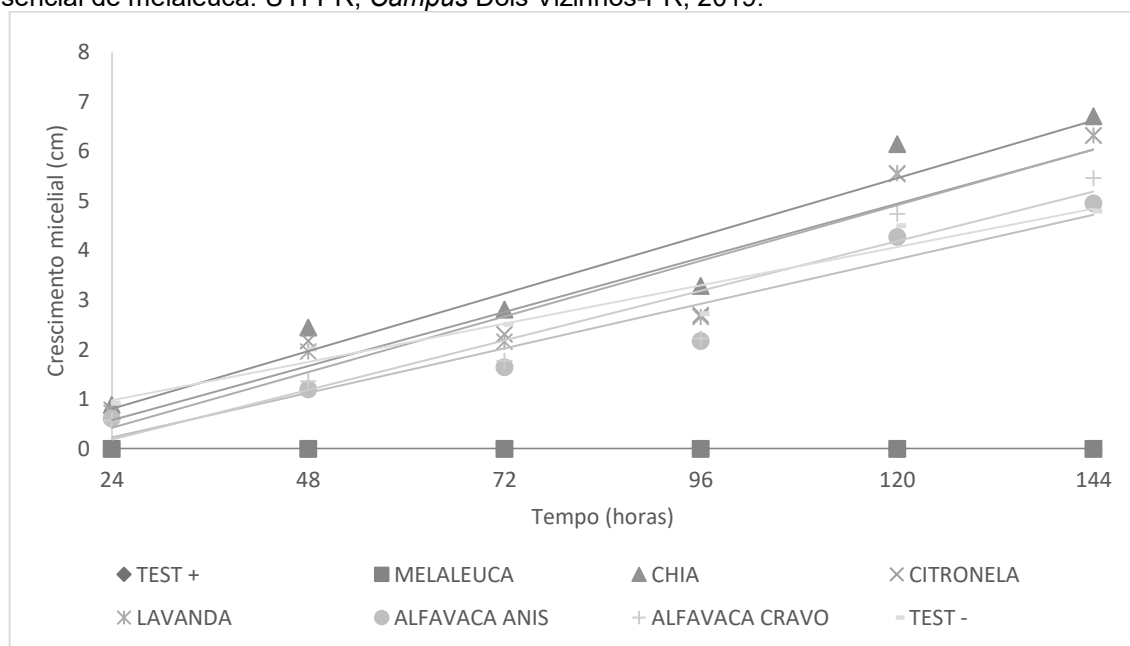
Causas da variação	GL	QM		
		Germinação	Plântulas anormais	Teor de Proteínas
Tratamento (A)	2	36,0000 ^{ns}	1.036,0208*	64,2796*
Tempo (B)	3	219,0000*	1.702,2500*	1.217,7464*
A x B	6	5,3333 ^{ns}	362,0208*	39,9349*
Erro	36	2.522,222	8,8056	181,950
Total	47	-	-	-
Média	-	90,75%	10,46	7,47
CV(%)	-	5,53	28,37	18,05
Causas da variação	GL	QM		
		Glucanase	Quitinase	
Tratamento (A)	2	4,5311*	2,6844 ^{ns}	
Tempo (B)	3	1,1799*	-	
A x B	6	0,2275 ^{ns}	-	
Erro	36	0,1089	0,6946	
Total	47	-	-	
Média	-	0,51	1,15	
CV(%)	-	64,36	72,55	
Causas da variação	GL	QM		
		Porcentagem de Micélio na Semente	Crescimento micelial	
Tratamento (A)	2	914,0208*	51,5403*	
Tempo (B)	3	320,2778*	69,3663*	
A x B	6	223,7986*	3,6256*	
Erro	36	441,670	0,2530	
Total	47	-	-	
Média	-	6,67%	2,29 cm	
CV(%)	-	31,52	21,95	

*Significativo a 5% de probabilidade de erro. ^{ns}Não significativo a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: O autor (2020).

Por meio da Figura 05, é observado que a testemunha sem inóculo contendo apenas a semente tratada com água destilada, isenta do inóculo do fitopatógeno, não apresentou crescimento micelial no decorrer das 144 h, o mesmo procedeu para o óleo essencial de melaleuca, que impediu o crescimento micelial de *F. oxysporum*. Diferente dos demais óleos de chia, citronela, lavanda, alfavaca anis, alfavaca cravo, e da testemunha negativa, contendo apenas o fitopatógeno, isento de qualquer óleo, onde houve crescimento micelial.

Figura 05 – Crescimento micelial (cm) de oito níveis de tratamentos (Test +, Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo e Test -) em função de seis tempos de análise (24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas) de um experimento bifatorial, inteiramente ao acaso tratados com 20 uL de óleo essencial de melaleuca. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2019.



Óleos essenciais	Equação/média	R ² ajustado
TEST +	$\bar{y} = 0$	
MELALEUCA	$\bar{y} = 0$	
CHIA	$y = -0,3537+0,0485x$	90,97
CITRONELA	$y = -0,5121+0,0455x$	87,68
LAVANDA	$y = -0,697+0,0468x$	88,21
ALFAVACA ANIS	$y = -0,667+0,0374x$	90,87
ALFAVACA CRAVO	$y = -0,8117+0,0417x$	89,21
TEST -	$y = 0,2071+0,0322x$	93,37

Fonte: O autor (2020).

Como o ressaltado na Figura 05 e Tabela 03, o óleo essencial de chia foi o que proporcionou o maior crescimento micelial de *F. oxysporum*, acompanhado na sequência por citronela, lavanda, alfavaca anis, alfavaca cravo e testemunha com inóculo.

Tabela 03 – Média de Crescimento micelial (cm) em função de oito níveis de tratamentos (Test +, Melaleuca, Chia, Citronela, Lavanda, Alfavaca Anis, Alfavaca Cravo e Test -) de um experimento bifatorial, inteiramente ao acaso. Na concentração 100% e dose de 20 uLdo óleo essencial de melaleuca. UTFPR, *Câmpus* Dois Vizinhos-PR, 2019.

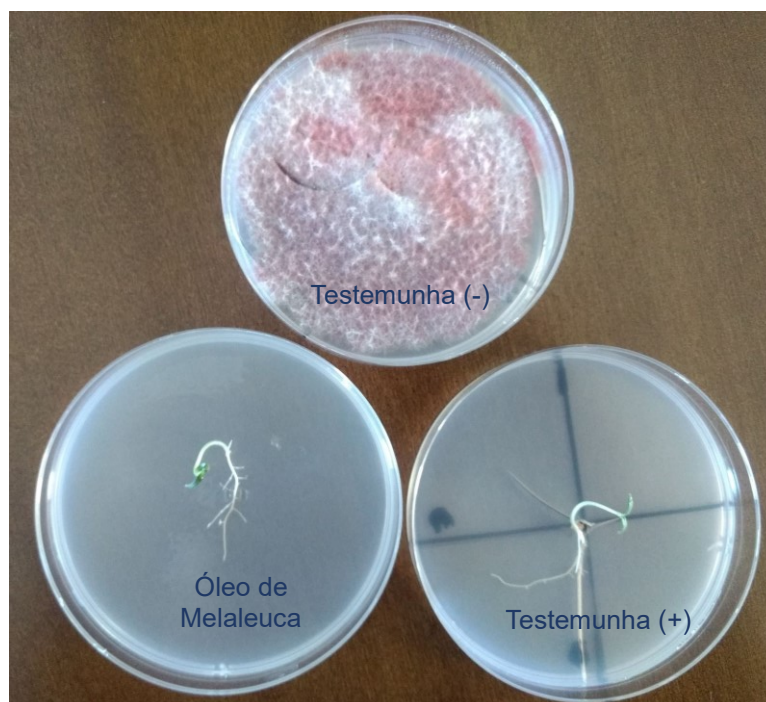
Óleos essenciais	Média de Crescimento Micelial (cm)
TEST COM INÓCULO	0,00 c
MELALEUCA	0,00 c
CHIA	3,72 a
CITRONELA	3,31 ab
LAVANDA	3,23 ab
ALFAVACA ANIS	2,48 b
ALFAVACA CRAVO	2,69 ab
TEST SEM INÓCULO	2,91 ab

* Médias não seguidas por mesma letra, na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

Fonte: O autor (2020).

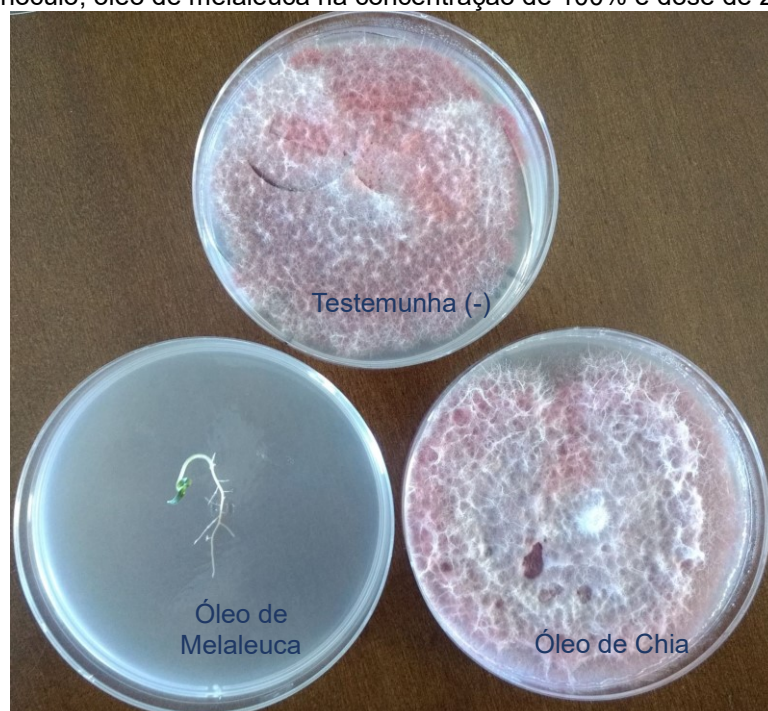
As Figuras 06 e 07 ilustram o resultado da figura 05 e tabela 03, às 144 h depois do início do tratamento, mostrando que não ocorreu crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* na testemunha sem inóculo e no tratamento com óleo essencial de melaleuca. O contrário acontece para os tratamentos; testemunha com inóculo, óleo de chia.

Figura 06 – Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* às 144 horas, nos tratamentos contendo a testemunha com inóculo, testemunha sem inóculo, e óleo de melaleuca na concentração 100% e dose de 20 uL.



Fonte: O autor (2020)

Figura 07 – Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* às 144 horas, nos tratamentos contendo a testemunha com inóculo, óleo de melaleuca na concentração de 100% e dose de 20uL e óleo de chia.



Fonte: O autor (2020).

Schuster-Russiano *et al.* (2019) estudando o uso dos óleos essenciais de guaçatonga, melaleuca e citronela sobre *Penicillium expansum*, também perceberam que estes reduziram o crescimento do fitopatógeno causador do mofo azul da macieira, todavia o óleo que inibiu em definitivo o crescimento de *P. expansum* foi o óleo essencial de citronela. O que mostra que cada óleo essencial age de uma forma sobre cada patógeno, além das metodologias aplicadas serem diferentes.

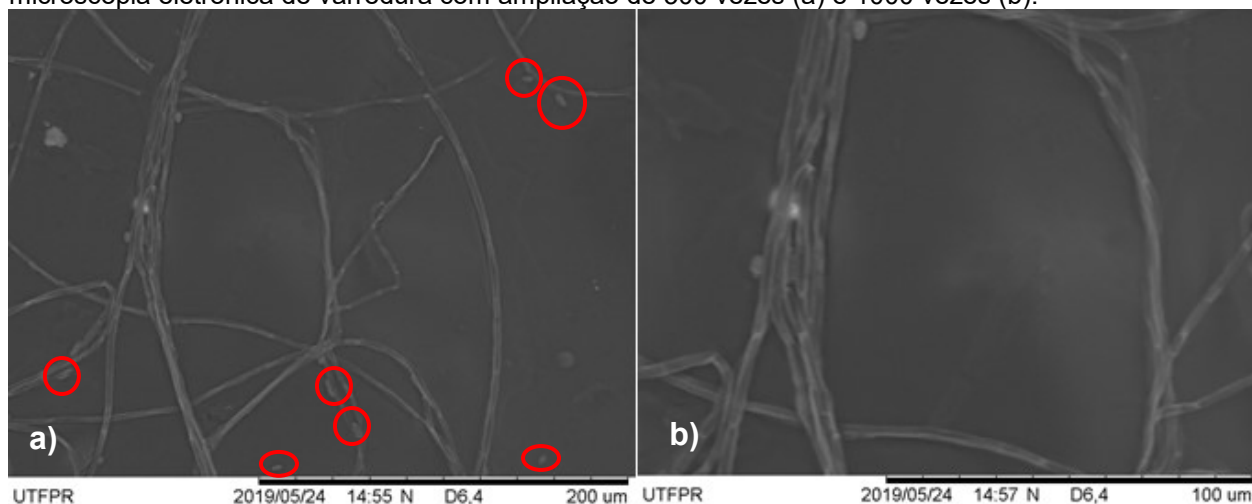
O óleo essencial de melaleuca também foi efetivo no controle de *Paenibacillus* (bactéria anaeróbica) causador da doença falciforme americana em colônias de abelha *Apis mellifera* pelo método da concentração inibitória mínima. Os autores atribuem o resultado pela composição antifúngica do óleo, contendo Terpinen-4-ol (29,09%), alfa-pineno (21,63%) e limoneno (17,4%) (FUSELLI *et al.* 2010).

4.2.1 Análise morfológica das hifas de *F. oxysporum* submetidas à expurgo com óleos essenciais

No sétimo dia de crescimento micelial, a placa contendo a testemunha com o patógeno *F. oxysporum* já possui em pequenas quantidades a presença de esporos

do fungo, as hifas se apresentam cilíndricas e há nitidez na parede celular, como mostra a Figura 08 destacada em vermelho.

Figura 08 - Hifas do tratamento testemunha com inóculo de *F. oxysporum* aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).

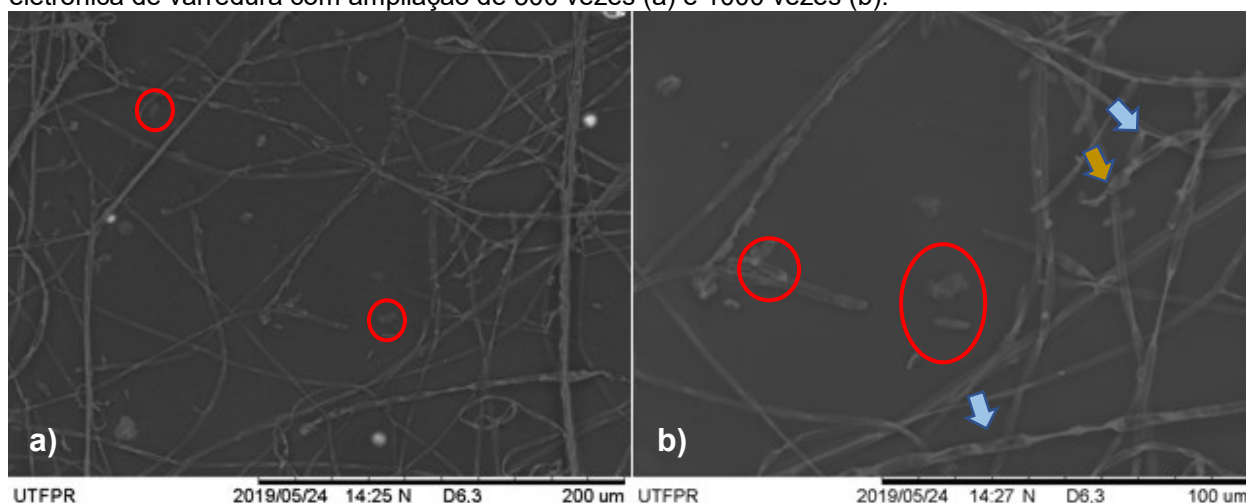


Fonte: O autor (2020).

Como já visto na Figura 05, não houve crescimento micelial no tratamento com o expurgo de óleo essencial de melaleuca e na testemunha sem inóculo, assim sendo, não foi possível realizar a microscopia eletrônica de varredura destes tratamentos.

Na Figura 09 se vê as hifas do fitopatógeno expurgado com óleo de chia. É notado que o óleo não impediu a esporulação do fitopatógeno (círculos em vermelho), porém as hifas foram danificadas, comparando com a testemunha, há um achatamento de hifas (setas em azul), enrolamento das hifas (seta em amarelo).

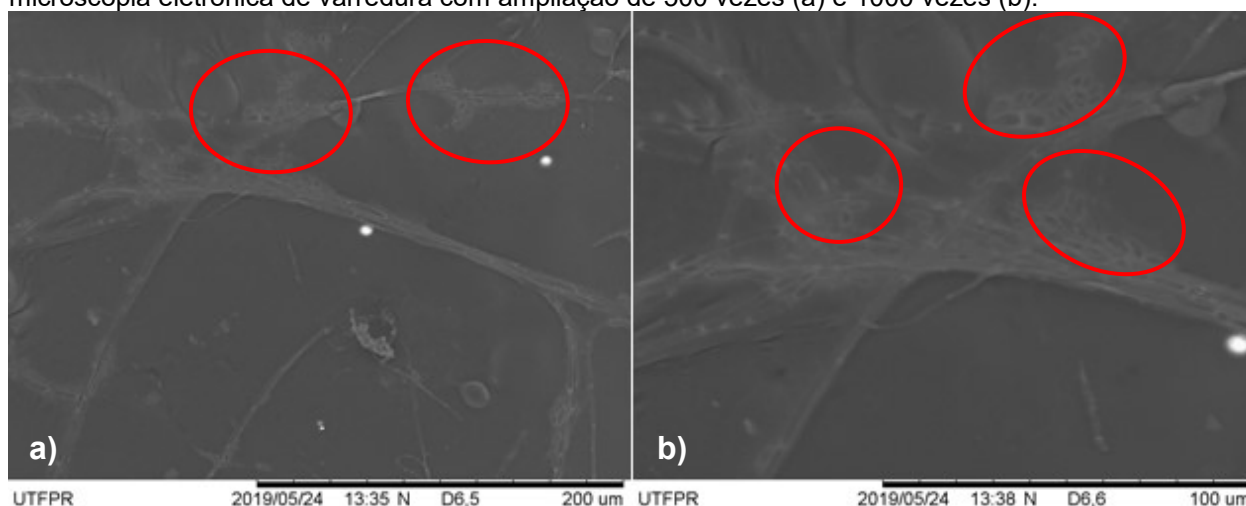
Figura 09 - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de chia aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).



Fonte: O autor (2020).

Pela Figura 10, se nota que as sementes tratadas com óleo essencial de citronela apresentaram uma superprodução de esporos (círculos em vermelho) em comparação com a testemunha. Uma superprodução de esporos pode estar associada a situação de estresse sofrida pelo patógeno, como o visto por Mello *et al.* (2018) ao submeter *Corynespora cassicola* sob diferentes regimes de luz e estresse.

Figura 10 - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de citronela aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).

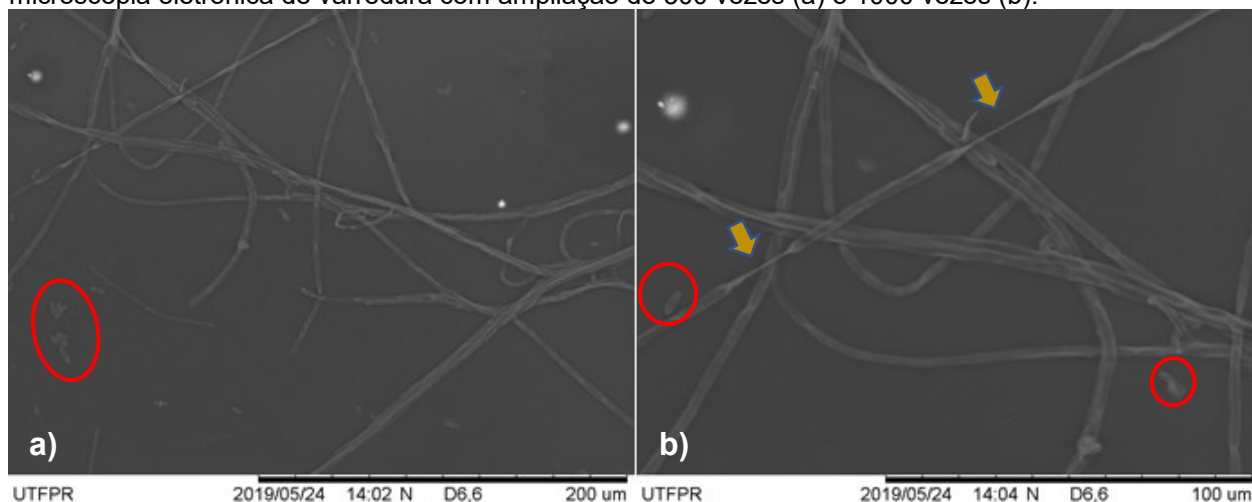


Fonte: O autor (2020).

A Figura 11 demonstra uma produção razoável de esporos (círculo em vermelho) que acompanha a testemunha, porém apresenta um achatamento/estreitamento de hifa (setas em amarelo), que como relatado na Figura

04, pode fazer com que ocorra no futuro o rompimento da mesma. Isso demonstra que o óleo essencial de lavanda proporcionou um dano na hifa.

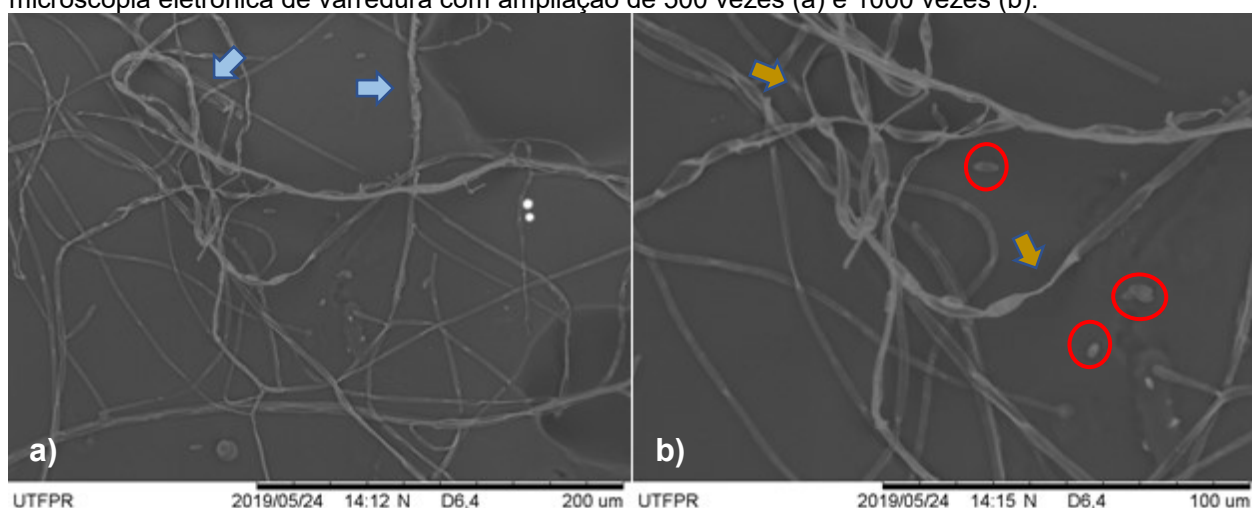
Figura 11 - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de lavanda aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).



Fonte: O autor (2020).

Na Figura 12, observa-se a produção normal de esporos (círculos em vermelho), havendo também um achatamento de hifas (setas em amarelo) e um enrolamento de hifas (setas em azul). Este achatamento/deformação pode representar uma perda de conteúdo celular já sofrido.

Figura 12 - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de alfavaca anis aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).

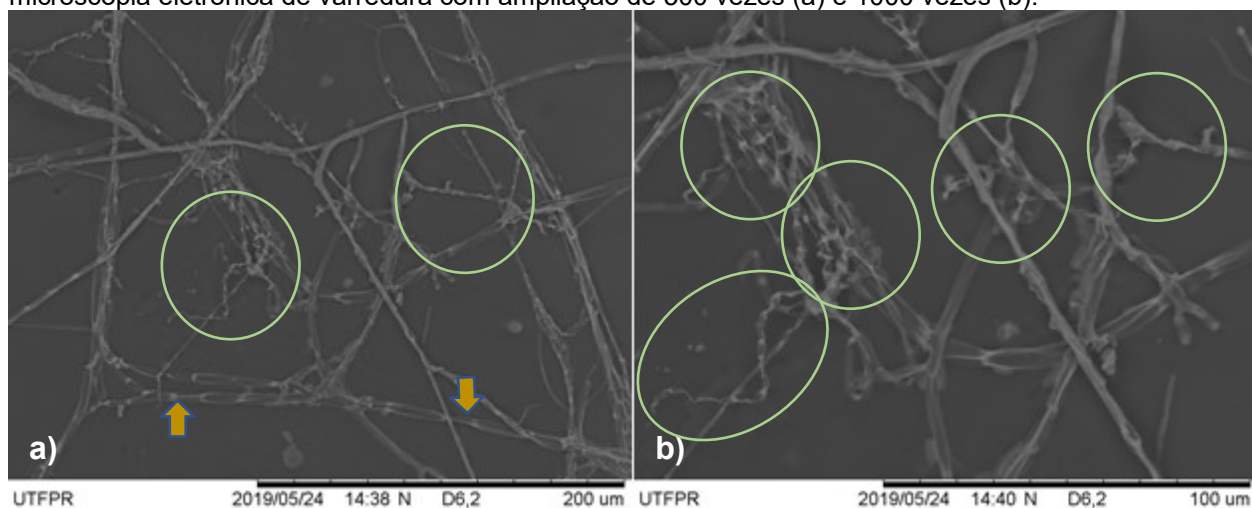


Fonte: O autor (2020).

Na Figura 13, percebe-se intensa desorganização celular: hiperseptação, enrolamento e achatamento das hifas, bem como, perda de nitidez da parede celular

(setas em amarelo), porém há um dano mais evidente proporcionado nas hifas pelo óleo essencial de alfavaca cravo (círculo em verde). Este dano na hifa, mostra o efeito fitotóxico do óleo sobre o *F. oxysporum*, capaz de destruir as hifas, proporcionando o extravasamento do conteúdo celular.

Figura 13 - Hifas de *F. oxysporum* do tratamento com óleo de alfavaca cravo aos sete dias vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes (a) e 1000 vezes (b).

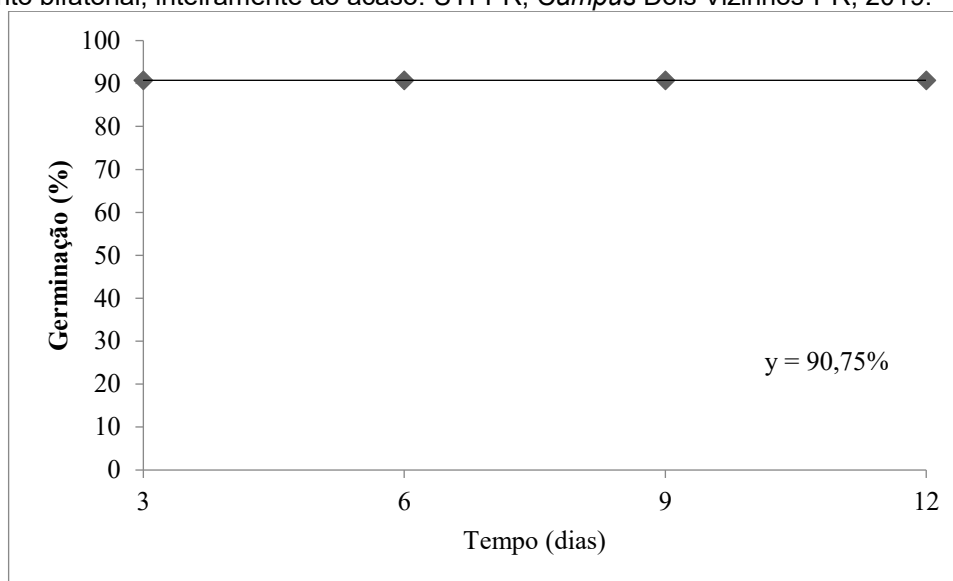


Fonte: O autor (2020).

4.3 GERMINAÇÃO COM ÓLEO DE MELALEUCA

Através da Figura 14, se nota que não houve diferença significativa para a variável porcentagem de germinação no decorrer do tempo, tendo atingido a média de 90% de germinação no dia 03, que se manteve até o 12 dia, não diferindo também entre os tratamentos com óleo de melaleuca + *F.oxysporum*; *F. oxysporum*; e água destilada. Portanto para todos os tratamentos houve uma média de germinação de 90%.

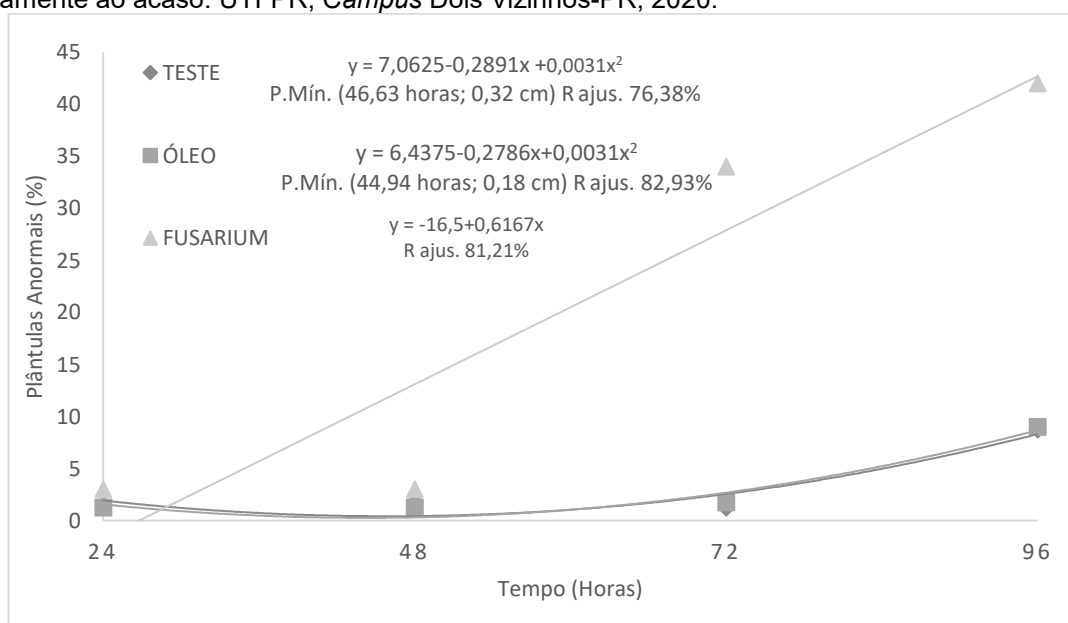
Figura 14 – Germinação, em % em função de quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12 dias) de um experimento bifatorial, inteiramente ao acaso. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2019.



Fonte: O autor (2020).

Percebe-se que a inoculação de *F. oxysporum* não interferiu na germinação das sementes, todavia interferiu na porcentagem de plântulas anormais (Figura 15 e Tabela 04). Silva (2018) também viu que sementes de tomate inoculadas com *Pseudomonas syringae* não interferiram na germinação das sementes, porém reduziram a variável altura de plantas; a autora também verificou que óleos essenciais de tomilho e citronela inibiram o crescimento da bactéria.

Figura 15 – Plântulas anormais (%) de três níveis de tratamentos (teste, óleo de melaleuca e *Fusarium oxysporum*) em função de quatro tempos de análise (24, 48, 72 e 96 h) de um experimento bifatorial, inteiramente ao acaso. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2020.



Fonte: O autor (2020).

Tabela 04 - Média de Plântulas anormais (%) em função três níveis de tratamentos (Teste, óleo e Fusarium) de um experimento bifatorial, inteiramente ao acaso. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2019.

Tratamentos	Plântulas anormais (%)
Testemunha sem inóculo	3,31 b
Óleo essencial de Melaleuca	3,31 b
Testemunha com inóculo <i>F. oxysporum</i>	20,50 a

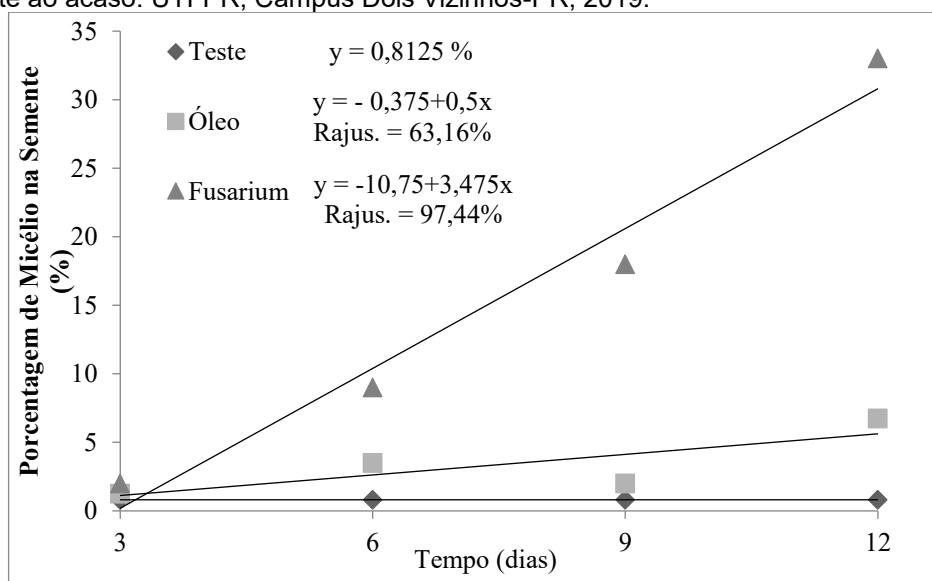
* Médias não seguidas por mesma letra, na vertical diferem entre si, em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

Fonte: O autor (2020).

A testemunha com inóculo contendo *F. oxysporum* apresentou crescimento linear, aumentando a porcentagem de plantas anormais com o passar do tempo, atingindo 40% no final das 96 h. Enquanto o óleo essencial de melaleuca, juntamente com a testemunha sem inóculo no final do período apresentaram em torno de 10% de plântulas anormais.

É percebido na Figura 16, que a testemunha com água destilada não apresentou micélio na semente, como o esperado, pois não ocorreu inoculação do patógeno. No décimo segundo dia o tratamento contendo apenas a inoculação com *F. oxysporum*, apresenta 35% das sementes contendo micélio, enquanto para o tratamento contendo óleo e *F. oxysporum*, apresenta 5%. Ou seja, uma redução de 80% de micélio presente nas sementes. Mostrando, a eficiência do expurgo com óleo essencial de melaleuca.

Figura 16 – Porcentagem de micélio de *F. oxysporum* na semente (%) em função três níveis de tratamentos (teste, óleo e *Fusarium* sp.) versus quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12), conduzido inteiramente ao acaso. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos-PR, 2019.



Fonte: O autor (2020).

Isto ocorre devido ao óleo essencial ser capaz de agir na parede celular do fungo, ocasionando o extravasamento do conteúdo celular, podendo este fato estar ligado à oxidação lipídica da membrana celular que ocorre devido a componentes presentes no óleo essencial, o que ocasiona a morte do fungo (AMARRAL; BARRA, 2010).

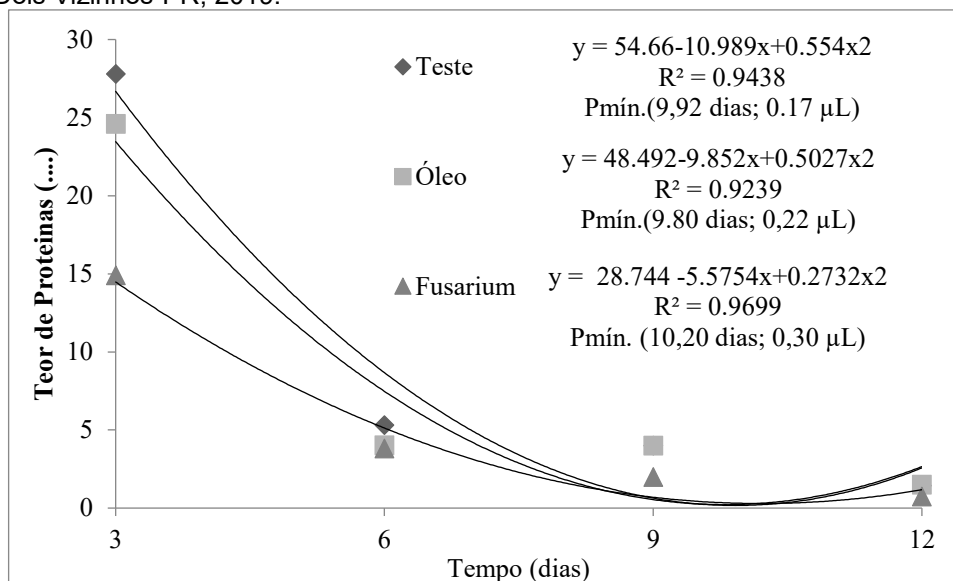
O terpinen-4-ol (37,4%) é o componente majoritário do óleo essencial de melaleuca, acompanhado de γ -terpineno (19,4%) e α -terpineno (9%) (BISHOP; THORNTON 1997). Sua atividade antifúngica e antibacteriana é demonstrada em inúmeros trabalhos, como o de Gioppo, Zancanaro e Bellaver (2019), onde perceberam que o óleo essencial de melaleuca foi capaz de inibir o crescimento de bactérias multirresistentes, em especial a bactéria hospitalar *Escherichia coli*. Souza *et al.* (2015) perceberam seu efeito sobre a inibição do crescimento micelial de *Cercospora beticola*, bem como diminuição da cercosporiose na cultura da beterraba, havendo ganho de peso e diâmetro no sistema radicular, não ocasionando fitotoxicidade.

Martins *et al.* (2010) também constatou o efeito do óleo essencial de melaleuca sobre o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*.

4.4 ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE RESISTÊNCIA

Através da Figura 17 se nota que ocorre o decréscimo no teor de proteínas ao decorrer do tempo, alcançando os níveis mais altos no terceiro dia de avaliação após germinação, e decrescendo no sexto, nono e décimo dias. No primeiro dia é percebido que o teor de proteínas nas sementes contaminadas com *F. oxysporum* é menor em relação a testemunha e demais tratamentos com óleo, isto pode ser ocorrido ao dano na semente decorrente do patógeno.

Figura 17 – Teor de proteínas em função três níveis de tratamentos (teste, óleo e *Fusarium* sp.) versus quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12), conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, Campus Dois Vizinhos-PR, 2019.

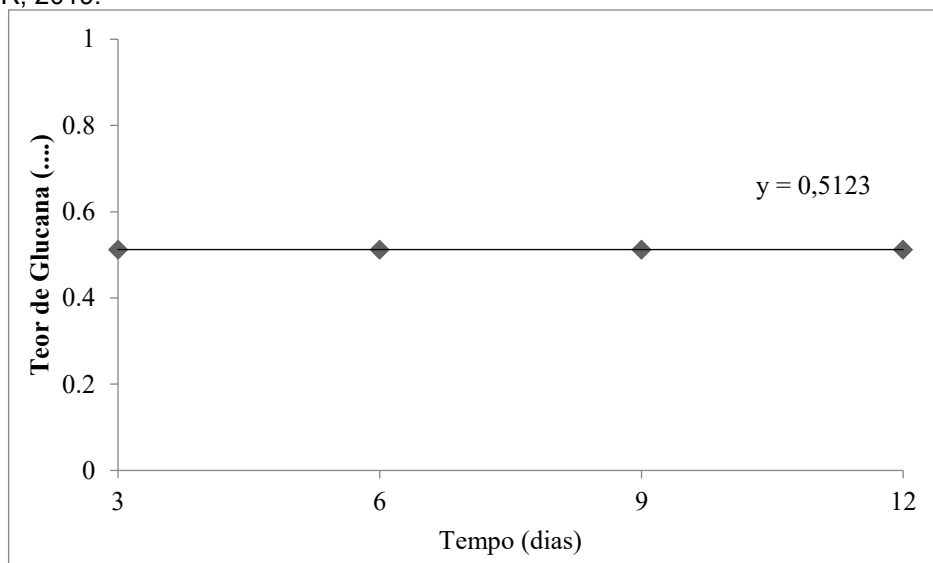


Fonte: O autor (2020).

Este decréscimo pode ser justificado porque ao longo do processo germinativo, ocorre o uso dos nutrientes de reserva da semente, como a proteína, para que haja o desenvolvimento necessário da plântula até que a mesma seja autotrófica. Isto é visto em experimento com *Melanoxylon brauna*, onde há a redução de carboidratos solúveis, lipídios e proteínas no decorrer do processo de germinação (ATAÍDE *et al.* 2017), e visto também em *Caesalpinia peltophoroides*, onde há redução gradativa de carboidratos e proteínas solúveis durante a germinação (CORTE *et al.* 2006).

No teor de glucanase (Figura 18) não houve diferença significativa no decorrer do tempo.

Figura 18 – Teor de glucanase em função de quatro tempos de análise (3, 6, 9 e 12 dias) de um experimento bifatorial, conduzido no delineamento inteiramente casualizado. UTFPR, Campus Dois Vizinhos-PR, 2019.



Fonte: O autor (2020).

No decorrer da germinação as enzimas hidrolíticas, como β -glucanase, degradam substâncias de reserva para gerar substratos para o processo respiratório, hidrolizando amido em açúcares menores, logo há o aumento da atividade enzimática no decorrer do processo germinativo (POPINIGIS, 1985). Neste caso, não houve o aumento, mas a β -glucanase manteve-se constante até o 12 dia.

Não houve relação/leitura de quitinase nas sementes de tomate do presente estudo.

Com estes resultados, nota-se que não ocorre relação de indução de resistência, visto que para que isto ocorra a atividade das β -glucanases, quitinase e proteínas deveriam aumentar (BETTIOL, MORANDI, 2009). Como ocorre em experimento realizado por Borsatti *et al.* (2015) onde ocorreu indução de resistência através do aumento do teor de proteínas e β -1,3-glucanase através do uso de ácido salicílico na pós-colheita de amora-preta.

5 CONCLUSÃO

Nota-se que o óleo essencial de melaleuca pode inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, sem prejudicar a germinação das sementes de tomate cereja. Todos os óleos estudados e que puderam ser vistos no microscópio eletrônico de varredura, ocasionaram danos morfológicos nas hifas do fungo. Os testes subsequentes com este óleo, também demonstram que com o óleo essencial de melaleuca há a redução da presença de micélio nas sementes de tomate cereja submetidas ao teste de germinação e redução de plântulas anormais, em comparação com a testemunha negativa. Não houve aumento de β -glucanases, quitinase e proteínas, demonstrando neste estudo que não ocorreu indução de resistência nas plântulas de tomate, nem pelo óleo essencial de melaleuca nem pela presença de *F. oxysporum*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de melaleuca é uma boa opção para o expurgo em sementes de tomate cereja, reduzindo o inóculo de *Fusarium oxysporum* e deste modo reduzindo a ocorrência de murcha de *Fusarium* em tomateiro. O uso do expurgo com o óleo essencial reduz a quantidade de óleo empregado, reduzindo também os custos, além de ser uma opção que não confere riscos ambientais ou a saúde humana e animal.

REFERÊNCIAS:

ALMEIDA, F. *et al.* Efeitos de extratos alcoolicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna. **Rev. Brasileira de eng. agriola e ambiental**, V.9, N.4, P.585-590, 2005.

ALMEIDA, L. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais na germinação e no vigor em sementes de tomate. **Rev. Biotemas**, 32 (2), junho de 2019.

AMARAL, M.F.Z.J., BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Rev. Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.5-8, 2005.

ARMIJOS JARAMILLO, V. D. **Clonación y caracterización de genes efectores de especies patogénicas del género Phytophthora que atacan cultivos de la familia solanaceae en los Andes del Ecuador.** [s. l.], 2007.

ATAÍDE, G.M. *et al.* Alterações nas reservas de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott. (Fabaceae Caesalpinoideae) durante a germinação em diferentes temperaturas. **Rev. Agrária**, Recife, v.12, n.3, p.372-379, 2017.

BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B., **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**, Embrapa, pág. 140, 141, Jaguariúna-SP, ano 2009.

BISHOP, C.D. & THORNTON, I.B. Evaluation of the antifungal activity on the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogens. **Journal of Essential Oil Research** 9: 77-82. 1997.

BORSATTI, F. C. *et al.* Indução de resistência e qualidade pós-colheita de amora-preta tratada com ácido salicílico. **Rev. Bras. Frutic.** Vol.37, n.2, pp.318-326, 2015. ISSN 0100-2945.

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

CARVALHO, J. L., PAGLIUCA, L. G. **Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente.** Hortifruti Brasil, 2007.

CARVALHO, N. M. **Sementes: ciência, tecnologia e produção** [S.L.] : FUNEP, 2000.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Bacteriology**, v.78, n.03, p.264–269, 1995

CASTRO, H. G. *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais, metabolitos secundários**, pág. 12, 13 e 14, 2ª edição, Viçosa-MG, ano de 2004.

CAVALCANTI, U.W., ALMEIDA, L.F.D., PADILHA, W.N.P. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, 2011.

CORTE, V.B. *et al.* Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e

crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. **Rev. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.941-949, 2006

CRUZ, M.E.S. *et al.* Plant extracts for controlling the post-harvest anthracnose of banana fruit. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 15, n. 4, supl. 1, p. 727-733, 2013.

CLEMENTE, F. M. V. T. Produção de tomate para processamento industrial. [s.l.] : Embrapa Hortaliças, 2012.

DIAS-ARIEIRA, C. R. *et al.* Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa phytopathol.**, Botucatu , v. 36, n. 3, p. 228-232, set. 2010 .

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. UFV- Universidade Federal de Viçosa, 2008.

FUSELLI, S.R. *et al.* In vitro antibacterial effect of exotic plants essential oils on the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood. **Span J Agric Res** (2010) 8(3), 651-657.

GIOPPO, A., ZANCANARO V., BELLAVER, E.H. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. **Rev. Biotemas**, setembro de 2019.

ISENBERG, M. & NOZAKI, M.H. Controle alternativo de *Diplocarpon rosae*. **Rev. Varia Scientia Agrárias**, Toledo, v.3, n.2, p.135-145, 2013.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia**, volume 2, doenças das plantas cultivadas. Capítulo 67, pg 620-621, 2005.

KIMATI, H. *et al.* Manual de fitopatologia volume 2, doenças das plantas cultivadas terceira edição. Editora agronômica ceres LTDA, Pg 713, 1997. MINAMI, K.; MELLO, S. da C. **Fisiologia e nutrição do tomateiro**. SENAR-PR, 2017.

LOBATO, A. K. S. *et al.* Ação do Óleo Essencial de *Piper aduncum* L. Utilizado como Fungicida Natural no Tratamento de Sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Rev. Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 915-917, jul. 2007.

LORINI, I. *et al.* Expurgo da semente de soja com fosfina e seu efeito na qualidade fisiológica – Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 12 p.

LORINI, I. *et al.* Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas. Brasília, DF : Embrapa, 2015. 84 p. : il.

MARTINS, J. A. S., *et al.* Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 49-51. 2010.

NASCIMENTO, W. M. **Produção de sementes de hortaliças**. Embrapa hortaliças, 2004.

OLIGINI, K.F. *et al.* Potencial de óleo de chia (*Salvia hispanica*) no controle do mofo cinzento em pós-colheita de morangos e de *Botrytis cinerea* in vitro. 406. **Rev. Bras. Pl. Med.**, São Paulo, v.19, n.3, p.406-414, 2017.

PEREIRA, R. M.; STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. EMBRAPA, 2008.

PENTEADO, S. R. Cultivo orgânico de tomate. [s.l.] : Aprenda Fácil, 2004.
ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Controle biológico de doenças em plantas**. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

SCHUSTER-RUSSIANO, M.C. *et al.* Óleos essenciais de citronela, melaleuca e guaçatonga no controle de *Penicillium expansum*. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 21277-21283, out. 2019. ISSN 2525-8761.

SILVA, J. C., BETTIOL, W. **Possibilidade de controle da murcha de *Fusarium* do tomateiro com isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênico**. Comunicado técnico, Jaguariúna SP, junho, 2006.

SILVA, D. T. *et al.* ANÁLISE DO EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE O RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Nectandra grandiflora* Nees¹. **Revista Árvore**, vol.39, no.6, 2015. ISSN 0100-6762.

SILVA, E. O. Termoterapia e óleos essenciais no controle de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em sementes de tomate. Tese. Unesp, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018

SOUZA, G. S. *et al.* Potencial alelopático de seis espécies do gênero *Croton* L. na germinação de alface e tomate. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 72, n. 2, p. 155-160, 2017.

SOUZA, A.D. *et al.* Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1078-1082, 2015.

SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3., p. 183-189, 2010.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Rev. Práxis**, ano V, nº 9. junho de 2013.

ZAMBOLIN, I. RIBEIRO DO VALE, F.X., COSTA, H. **Controle de doenças de plantas hortaliças**, volume 1, Capítulo 12, pg 304 e 393, 2000.