



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL

CURSO DE AGRONOMIA

JOVANA DA ROSA LOPES

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA PINTA
PRETA (*Alternaria solani*) E DA SEPTORIOSE (*Septoria lycopersici*) NO
TOMATEIRO**

LARANJEIRAS DO SUL

2018

JOVANA DA ROSA LOPES

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DE PINTA
PRETA (*Alternaria solani*) E SEPTORIOSE (*Septoria lycopersici*) NA CULTURA
DO TOMATEIRO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador Prof. Gilmar Franzener.

LARANJEIRAS DO SUL

2018

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Lopes, Jovana da Rosa

EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA PINTA PRETA (*Alternaria solani*) E DA SEPTORIOSE (*septoria lycopersici*) NO TOMATEIRO/ Jovana da Rosa Lopes. -- 2018.

33 f.

Orientador: Gilmar Franzener.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2018.

1. Proteção de plantas. 2. fitossanidade. 3. Doenças no tomateiro. I. Franzener, Gilmar, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

JOVANA DA ROSA LOPES

**EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NO CONTROLE ALTERNATIVO DA
PINTA PRETA (*Alternaria solani*) E DA SEPTORIOSE (*Septoria lycopersici*)
NO TOMATEIRO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de colação de grau de Bacharel em Agronomia Linha de formação em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul (PR)

Orientador: Gilmar Franzener

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em 26/06/18

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gilmar Franzener
(UFFS)



Profa. Dra. Aline Pomari Fernandes
(UFFS)



PNPd. Gabriela da Silva Moura
(UFFS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me concedido o dom da vida, ao meu esposo Luiz Carlos por ser paciente, compreensivo e companheiro de todas as horas e também por me motivar todos os dias.

Aos meus pais pela educação que recebi e pelo exemplo que me deram desde pequena.

E a minha irmã Juliana por ser exemplo na minha vida.

Em especial ao ProfºDr. Gilmar Franzener que não mediu esforços na orientação do trabalho, ao grande amigo que se tornou.

A Prof.Drª. Gabriela Silva Moura pelo apoio, pela amizade e muitos ensinamentos.

Aos professores que durante a graduação contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas que sempre estiveram ao meu lado durante a graduação.

RESUMO

O tomateiro representa uma das principais hortaliças cultivadas, mas sua produção é limitada pela ocorrência de problemas fitossanitários pelas doenças que afetam a produção. O objetivo deste trabalho foi contribuir no controle alternativo das doenças de pinta preta e septoriose, *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici* do tomateiro com o uso de extrato etanólico de própolis (EEP). Foram realizados bioensaios de crescimento micelial e de germinação de esporos para avaliar a atividade antifúngica direta do extrato etanólico de própolis sobre *A. solani* e *S. lycopersici*. Constituíram tratamentos nos bioensaios o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% e como testemunha com água destilada. Para o crescimento micelial os tratamentos foram incorporados em meio BDA autoclavados e não autoclavado. As avaliações foram realizadas através das medições diárias do diâmetro das colônias após cinco dias da instalação do experimento. Também foi avaliada a germinação de esporos e tamanho médio de tubo germinativo de *A. solani* e *S. lycopersici*. Sob condição de casa de vegetação foram conduzidos experimentos para avaliação da severidade das doenças e análises bioquímicas. Para tanto os tratamentos foram pulverizados em plantas de tomateiro com 45 dias após semeadura e 72 horas após foi realizada a inoculação dos fungos. Em outro experimento, as plantas de tomateiro foram pulverizadas e não houve a inoculação com fungos foi realizada a coleta de amostras para análises de enzimas relacionadas a defesa. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. O EEP apresentou atividade antifúngica inibindo o crescimento micelial e a germinação dos esporos de ambos os fitopatógenos com inibição de 100% na maior concentração. Houve tendência no aumento da atividade das enzimas. Com exceção da polifenoloxidase em folhas de tomate tratadas com diferentes concentrações de EEP. De acordo com a equação quadrática o ponto de máxima atividade da enzima foi de 2,0%. Então na concentração 3% houve diminuição da atividade enzimática. Esses resultados indicam o potencial do EEP na proteção de plantas de tomate a *A. solani* e *S. lycopersici*.

Palavras-chaves: Proteção de plantas, fitossanidade, Doenças no tomateiro.

ABSTRACT

The tomato represents one of the main cultivated vegetables, but its production is limited by the occurrence of phytosanitary problems by the diseases that affect the production. The objective of this work was to contribute to the alternative control of diseases of black and septoriose, *Alternaria solani* and *Septoria lycopersici* of the tomato with the use of propolis ethanolic extract (EEP). Mycelial growth and spore germination bioassays were performed to evaluate the direct antifungal activity of the propolis ethanolic extract on *A. solani* and *S. lycopersici*. The bioassays were the ethanolic extract of propolis at concentrations of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 3.0% and as control with distilled water. For mycelial growth the treatments were incorporated in autoclaved and non-autoclaved BDA medium. The evaluations were performed through the daily measurements of the diameter of the colonies after five days of the installation of the experiment. Germination of spores and germination size of *A. solani* and *S. lycopersici* were also evaluated. Under greenhouse condition experiments were conducted to assess the severity of the diseases and biochemical analyzes. The treatments were sprayed on tomato plants 45 days after sowing and 72 hours after inoculation of the fungi. In another experiment, the tomato plants were sprayed and there was no inoculation with fungi. Samples were collected for analysis of defense-related enzymes. The experiments were conducted in a completely randomized experimental design (DIC) with four replicates. EEP showed antifungal activity inhibiting mycelial growth and spore germination of both phytopathogens with 100% inhibition at the highest concentration. There was a tendency in the increase of the activity of the enzymes. With the exception of polyphenoloxidase in tomato leaves treated with different concentrations of EEP. According to the quadratic equation the maximum activity point of the enzyme was 2.0%. At the 3% concentration, there was a decrease in the enzymatic activity. These results indicate the potential of the EEP in the protection of tomato plants to *A. solani* and *S. lycopersici*.

Key words: Plant protection, phytosanitary, Diseases tomato.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	9
3. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1 A cultura do tomate	9
3.2 Doença do tomateiro: A pinta preta	10
3.3 Doença do tomateiro: A septoriose.....	11
3.4 Controle alternativo de doenças em plantas.....	12
3.5 Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal	13
3.6 Própolis	14
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	15
4.1 Bioensaio de atividade antifúngica	15
4.2 Ensaio de proteção de plantas de tomateiro	16
4.3 Análises bioquímicas	16
4.3.1 Atividades de peroxidases	17
4.3.2 Atividade de Polifenoloxidasas	17
4.3.3 Atividades de Fenilalanina amônia-liase (FAL)	17
4.6 Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pertence à família das solanáceas, a mesma da batata, berinjela, pimenta e tabaco, com origem na região da América do Sul, é uma planta herbácea, embora seja uma planta perene, a cultura comporta-se como uma planta anual (FÁVARIS et al., 2016).

Segundo dados da FAO, (2016) a produção mundial de tomates em 2016 foi de 163,9 milhões de toneladas. A China foi o maior produtor mundial de tomates no ano com 50,5 milhões de toneladas, e representa 31% da produção do planeta. A produção brasileira naquele ano foi de 4,1 milhões de toneladas e 8ª maior, correspondendo a 3% do total mundial.

De acordo com os dados do IBGE, a área brasileira no cultivo de tomate na safra 2017 foi 58,6 mil hectares. Na safra 2017 a produção foi de 3,787 mil toneladas, a produtividade foi de 64.618 kg/ha.

No entanto, a produção de tomate no Brasil é limitada por vários fatores, com destaque para ocorrência de pragas e doenças. O elevado número de doenças que reduzem ou até mesmo impedem a produção do tomateiro impulsionam o uso intensivo de grandes quantidades de agroquímicos na cultura (SILVEIRA et al., 2007).

As doenças são responsáveis por prejuízos significativos na produção. Para evitar esse problema, os produtores adotam medidas de controle que, na maioria das vezes, resumem-se ao uso de produtos químicos. A utilização do controle químico de maneira abusiva e indiscriminada, pode gerar poluição ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos (FRANZENER et al., 2007).

Nesse contexto, assume importância o controle alternativo, que busca medidas de controle de doenças que minimize o impacto negativo a saúde e ao meio ambiente (LUCAS, 2012). Como exemplo de medidas alternativas de controle de doenças há o controle biológico que utiliza um microrganismo antagônico que tem ação direta sobre o organismo patogênico. Também a indução de resistência que envolve a ativação de mecanismo de defesa latentes nas plantas em resposta a tratamentos com agentes abióticos e bióticos (BETTIOL, 1991). Derivados de plantas, como extratos, também tem demonstrado potencial no controle alternativo de doenças, podendo agir como protetores ou indutores de resistência.

A exemplo o uso do extrato etanólico de própolis, segundo Silva et al. (2006), é uma substância resinosa coletada pelas abelhas melíferas a partir de diferentes exsudatos de plantas, como secreções de árvores, folhas e flores. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias tem reconhecidas propriedades antimicrobianas, mas há a dúvida se o extrato etanólico de própolis promove o controle da pinta preta e da septoriose do tomateiro, e apresenta efeito antifúngico direto sobre os agentes causais dessas doenças.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Contribuir no controle alternativo das doenças de pinta preta e septoriose do tomateiro com o uso de extrato etanólico de própolis.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar o efeito in vitro de diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici*.

Avaliar in vivo o efeito do extrato de própolis na proteção de plantas de tomateiro sob *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici*.

Avaliar a indução de enzimas relacionadas à defesa pelo extrato etanólico de própolis em plantas de tomate como indicativo de possíveis mecanismos de ação envolvidos na defesa vegetal.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A cultura do tomate

O tomateiro é considerado uma hortaliça que pode ser cultivada em diferentes regiões, espécie cultivada originou-se da espécie silvestre *Lycopersicum esculentum* var. cerasiforme, originário da América do Sul, especificamente entre o Equador e o norte do Chile, região com diversas espécies do gênero *Lycopersicum* crescendo espontaneamente. Sua domesticação ocorreu no México e foi difundido ao mundo pelos espanhóis e portugueses através de suas colônias. Quanto à introdução do

tomate no Brasil deve-se a imigrantes europeus no final do século XIX (FÁVARIS et al., 2016).

O tomateiro é uma solanácea herbácea com desenvolvimento de forma rasteira, semi-ereta ou ereta, apresenta variedades de crescimento limitado ou determinado e variedades de crescimento ilimitado ou indeterminado, que condicionam o tipo de cultura. O consumo do fruto de tomate está relacionado a atributos como aparência, sabor, aroma, textura e valor nutricional. Na composição dos frutos, que varia de acordo com a cultivar, nutrição, condições de cultivo e as ambientais na fase de produção, apresenta baixo poder calórico, baixo teor de matéria seca e é muito rico em cálcio e vitamina C (ALVARENGA, 2004).

O tomate foi a primeira olerícola a ser industrializada, em virtude de suas características fisiológicas, que apresenta grande fragilidade, podendo levar a degradação do fruto em curto espaço de tempo (CAMARGO et al., 2006). As diversas formas de consumo do fruto, tanto na forma in natura, como na forma industrializada, propiciam ao tomate grande destaque quanto a sua importância (MORAES et al., 2011).

A cultura do tomate ou tomaticultura está presente em todo o território brasileiro, principalmente na região Sudeste. Esta região corresponde especialmente à produção de tomates de mesa. Já a região Centro-Oeste atua essencialmente na produção de tomates destinados à indústria (SOUZA et al., 2014).

3.2 Doença do tomateiro: A pinta preta

A pinta preta é uma doença de grande importância na cultura do tomateiro, podendo causar consideráveis perdas como a desfolha precoce, além do ataque aos frutos, expondo-os mais aos raios solares (KUROZAWA e PAVAN, 2016).

A doença é causada pelo fungo *Alternaria solani* Sorauer. A reprodução do patógeno ocorre pela formação de conídios multisseptados de cor escura, os quais podem ser simplesmente dispersos pelo vento e por respingos de água. O patógeno sobrevive em restos de cultura e em outros hospedeiros, como batata, berinjela e maria-pretinha (KUROZAWA e PAVAN, 2016). O patógeno penetra o hospedeiro diretamente ou através de estômatos e ferimentos, e, após a penetração, os sintomas aparecem entre três e cinco dias. Ele também pode ser transmitido pelas sementes (LOPES; SANTOS, 1994).

A pinta-preta ocorre em folhas, caules e frutos e pode causar danos durante qualquer estágio de desenvolvimento da planta. As lesões são mais comuns nas

folhas mais velhas. Essas lesões são necróticas, de cor marrom-escura a preta, e com o crescimento formam-se lesões alongadas e 4 circulares, com anéis concêntricos evidentes, podendo apresentar halo amarelado circundando a lesão (FILHO et al., 2008)

No caule ou no hipocótilo, as lesões são escuras e ligeiramente deprimidas. Em plântulas, as lesões podem roletar o hipocótilo, levando à ocorrência de murcha e até mesmo tombamento de plântulas. Nos frutos, são observadas lesões deprimidas, normalmente localizadas na região do cálice, podendo ser de grande extensão, coloração escura e aspecto aveludado e apresentar anéis concêntricos. Os frutos afetados normalmente caem no solo (ITAKO et al., 2008).

3.3 Doença do tomateiro: A septoriose

A cultura do tomateiro é suscetível a diversos problemas fitossanitários. Cerca de duzentas doenças, de causas bióticas e abióticas, que afetam a cultura do tomateiro já foram identificadas em todo o mundo (LOPES e ÁVILA, 2005). Os fungos são os microorganismos responsáveis pelo maior número destas doenças. Cerca de 40% dos custos de produção do tomateiro são atribuídos aos fungicidas utilizados no controle de doenças foliares (LOPES e SANTOS, 1994).

A septoriose ou mancha de septória, causada pelo fungo *Septoria lycopersici*, é uma doença importante nas épocas chuvosas, ocorrendo em quase todas as regiões produtoras de tomate do Brasil e do mundo. As perdas por esta doença podem ser grandes devido à destruição das folhas, iniciada nas folhas mais velhas (PEREIRA et al., 2013), contribuindo para a redução da área foliar responsável pela fotossíntese, além de expor os frutos à queima solar devido a queda foliar prematura (LOPES e ÁVILA, 2005).

Os sintomas iniciais da septoriose são observados nas folhas mais velhas através de numerosas manchas circulares e elípticas, com as bordas escurecidas e o centro cor de palha, que, frequentemente coalescem e provocam crestamento, queima intensa das folhas baixas e desfolha da planta (REIS et al., 2006). No centro das lesões, em condições de alta umidade, é possível notar pontos negros constituídos pela frutificação do fungo, os picnídios. No caule, no pecíolo e nas sépalas, as lesões são menores e mais escuras, podendo ou não apresentar picnídios. Os frutos do tomateiro raramente são afetados pelo fungo (JONES et al.1991).

Septoria lycopersici, que é um fungo mitospórico da classe dos Coelomicetos,

forma grande quantidade de picnídios, globulosos, subepidérmicos, ostiolados e de paredes definidas, dentro dos quais há formação das estruturas assexuais (ZAMBOLINI *et al.*, 2006). Os conidióforos são curtos com conídios filiformes e multisseptados, que são liberados em cirros hialinos (KUROZAWA; PAVAN, 2016). Por estarem agregados entre si por uma substância mucilaginosa, os conídios são disseminados por meio do impacto das gotas de água (LOPES ; ÁVILA, 2005).

Em condições de alta umidade nas folhas, os conídios em cirros são liberados dos picnídios, que são disseminados por respingo de água, proporcionado principalmente pela chuva e pela irrigação por aspersão (REIS *et al.*, 2006). Trabalhadores, implementos agrícolas e insetos, movendo-se entre as plantas úmidas, também podem disseminar o fungo (ZAMBOLINI *et al.*, 2000).

Na superfície do hospedeiro, os conídios germinam, penetram por meio dos estômatos e colonizam intercelularmente, formando haustórios que penetram nas células das plantas. Os sintomas iniciais surgem em cerca de 6 dias e os picnídios entre 10 dias e 14 dias. Temperaturas do ar entre 20 e 25°C são ótimas para infecção, manifestação de sintomas e desenvolvimento de picnídios (KUROZAWA; PAVAN, 2016). Assim, longos períodos de temperaturas amenas, alta umidade relativa do ar, chuvas abundantes ou irrigação por aspersão, constituem condições favoráveis para o desenvolvimento da doença (REIS *et al.*, 2006).

3.4 Controle alternativo de doenças em plantas

A sociedade vem exigindo a produção de alimentos com a mínima degradação dos recursos naturais. Entre esses, destacam-se os portadores de selos que garantem a não utilização de agrotóxicos no processo produtivo. Com isso, sistemas de cultivo mais sustentáveis têm sido desenvolvidos, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos (BETTIOL,1991).

Na busca por métodos de controle de doenças que sejam menos danosas ao ambiente tem assumido grande importância o controle biológico e a indução de resistência em plantas e também outras formas, como o uso de produtos naturais com ação antimicrobiana podem ser incluídas (STANGARLIN *et al.*,2008).

O controle biológico mediante a utilização dos fungos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), no controle de doenças de plantas de pepino, maracujá e tomate, tem demonstrado resultados positivos (DI PIERO, 2003). Balbi-Peña *et al.* (2006) encontraram resultados positivos no controle de *A. solani* com extratos de *Curcuma longa* e Curcumina.

Em trabalho realizado com extratos de plantas medicinais de *Achillea millefolia*, *Artemisi camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalles* sob a *A. solani*, verificou-se redução de número de lesões em relação a testemunha (ITAKO et al., 2008). Carneiro (2003) constatou que o óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica*) em concentrações baixas foi eficiente no controle de oídio no tomate.

Ferreira (2013) avaliou o uso de extratos de folhas de erva cidreira e de sementes de graviola e observou efeito inibitório do crescimento micelial do *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose no mamoeiro, indicando que extratos apresentam potencial no controle do patógeno.

3.5 Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal

As plantas possuem diversos mecanismos de defesa que podem ser ativados quando expostas a agentes indutores (BARROS, 2010).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas em respostas ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos que induzem os mecanismos de defesa da planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Esse fenômeno tem sido muito estudado e com grande potencial no controle alternativo de doenças (OLIVEIRA et al., 2016). Entre os mecanismos estudados merecem destaque as enzimas relacionadas a defesa vegetal, como peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase (ZHANG et al., 2008).

Peroxidases é uma enzima das plantas, que está envolvida em diversas reações, lignificação, oxidação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos (CAMPOS e SILVEIRA, 2003).

Polifenoloxidase é uma enzima que atua no mecanismo de defesa da planta sob doenças e inibe o ataque de insetos (MURATA et al., 1995), sua grande importância é devido a propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas que são muito tóxicos para microorganismos (CAMPOS e SILVEIRA, 2003).

Ao testar o efeito indutor do ácido salicílico e o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* sobre cultivares de feijão, houve efeito positivo entre a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose (CAMPOS et al., 2004).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário, devido a importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e

estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, que são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico. São amplamente distribuídos nos vegetais, como guaco e a castanha da Índia, solúvel em etanol, éter etílico flavonóides e ligninas. A FAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

3.6 Própolis

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos. Durante a coleta da própolis, as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 1,3- glicosidase presente na sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas. A própolis é utilizada pelas abelhas para selar eventuais aberturas na colméia e para eliminar possíveis invasores (VARGAS et al., 2004).

As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química, e esta possivelmente é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exsudatos e menos importante, botões florais) e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (PEREIRA et al., 2002).

Vargas et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana in vitro da própolis em solução alcoólica a 50% sobre 161 isolados bacterianos provenientes de animais, na qual o extrato de própolis inibiu o crescimento de 67,7% das bactérias testadas.

Vieira e Andrade (2009) encontraram potencial antifúngico para a própolis na concentração de 1,6% sobre o controle do Oídio em quatro cultivares de pepino (Híbridos F1 Nikkey, Pódium, Runner e Supremo).

Pereira et al. (2008), afirmam que a própolis tem potencial para ser utilizada no controle de ferrugem e cercosporiose do cafeeiro, não só por suas propriedades químicas, mas também como um impedimento físico para a penetração dos micélios dos fungos, devido a formação de um filme protetor sobre as folhas do cafeeiro.

4. MATERIAS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia do campus da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, de Laranjeiras do Sul - PR.

A extração do extrato etanólico de própolis foi realizado utilizando álcool etílico na concentração de 15:85 (15 gramas de própolis para 85 mL álcool etílico 95%). Em seguida foi batido em liquidificador, mantido em “repouso” por 15 dias, quando foi filtrado em papel de filtro e diluído em concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% e a testemunha era constituída de água destilada, que foram utilizadas nos bioensaios.

4.1 Bioensaio de atividade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica direta dos extratos etanólico de própolis sobre *A. solani* e *S. lycopersici* foram realizados bioensaios de crescimento micelial e de germinação de esporos. Constituíram tratamentos o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0%, e água como testemunha. Os tratamentos foram incorporados em meio BDA e autoclavados por 20 min a 120 °C a 1 atm. Em outro ensaio os tratamentos foram incorporados após a autoclavagem, antes do meio ser vertido. Em seguida os meios foram vertidos em placas de petri e após solidificar foi adicionado ao centro de cada placa um disco de sete cm do respectivo fitopatógeno. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C e escuro. As avaliações foram realizadas no quinto dia através de medições perpendiculares quando as maiores colônias atingiram $\frac{3}{4}$ da placa.

Para o Teste de germinação não autoclavado foi avaliado o efeito antifúngico do EEP sobre *A. solani* e *S. lycopersici* com o teste de germinação de esporos e tamanho médio de tubos germinativos. Para tanto foram adicionados 35 microlitros de suspensão de esporos na concentração de 3×10^4 esporos/mL para *S. lycopersici* e 2×10^4 esporos/mL para *A. solani*. e 35 microlitros de cada tratamentos em cada uma das células de uma placa usada em teste de ELISA. A placa foi incubada em escuro a 25°C por 20 horas quando a germinação de esporos foi paralisada com 10 microlitros de azul algodão de lactofenol. A determinação da porcentagem de germinação foi realizada através da contagem de 100 esporos por parcela em

microscópio óptico, sendo considerados germinados os esporos que emitiram tubos germinativos maiores ou iguais ao menor diâmetro do esporo. Também foi determinado o tamanho médio dos tubos germinativos dos esporos germinados, sendo contado 10 tubos germinativos por repetição. A contagem e medição foi realizada ao microscópio óptico com auxílio de régua ocular

4.2 Ensaio de proteção de plantas de tomateiro

Para avaliar o efeito protetor do EEP sobre as doenças foi conduzido experimento em casa de vegetação. Sementes de tomateiro, variedade Santa Cruz Kada, foram semeadas em copos descartáveis de 500 mL contendo solo, húmus e substrato na proporção 1:1:1. Após 35 dias da semeadura foi realizada a aplicação dos tratamentos e após 3 dias realizada a inoculação com suspensão de esporos na concentração de 3×10^4 esporos/mL para *S. lycopersici* e 2×10^4 esporos/mL para *A. solani*.

A avaliação da severidade das doenças nas plantas de tomateiro teve início quando iniciarem os sintomas sendo realizadas avaliações a cada três dias. As avaliações foram realizadas com o auxílio da escala diagramática de Boff (1988), com cinco níveis de severidade de área foliar lesionada.

A partir dos dados obtidos na avaliação da severidade do patógeno foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). O cálculo da AACPD foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} (X_i + X_{i+1}) / 2 (t_{i+1} - t_i)$$

Em que:

X= severidade média da doença por planta; $X = x(t_1)$,

n= número de avaliações,

$(t_{i+1} - t_i)$ é o intervalo entre duas avaliações consecutivas

4.3 Análises bioquímicas

Para a avaliação de atividades de enzimas relacionados à defesa, foram conduzidos bioensaio em copos descartáveis de 500 mL contendo solo, húmus e

substrato na quantidade de 1:1:1, onde após 35 dias de transplantadas foi pulverizado o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 0, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0%. Após 72 horas dos tratamentos foram coletados discos foliares de 0,5 g que foram macerados em 4 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) contendo 1% de (p/p) de polivinil-pirrolidona, em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 14.500 g durante 20 min a 4°C. O sobrenadante obtido, considerando como extrato enzimático, foi utilizado para a determinação de atividade enzimática. Todo o material ficou sob refrigeração.

4.3.1 Atividades de peroxidases

A atividade de peroxidases nas amostras foram determinadas conforme metodologia proposta por Lusso e Pascholati (1999). Por tanto, a mistura foi constituída de 0,2 mL de extrato enzimático e 1,0 mL de substrato de enzima (306 microlitro de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A reação foi conduzida a 30°C. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância a 470 nm min^{-1} proteína^{-1} .

4.3.2 Atividade de Polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas foi determinada conforme a metodologia proposta por Duagmal e Apenten (1999). Para tanto, o substrato para enzima foi composto de catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 6,8). A reação foi conduzida misturando-se 900 microlitros do substrato e 100 microlitros do extrato enzimático seguida de leituras no espectrofotômetro, a 420 nm. Os resultados obtidos foram expressos em absorbância min^{-1} de proteína^{-1} .

4.3.3 Atividades de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade foi determinada de acordo com metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 microlitros de extrato enzimático foi acrescentado 400 microlitros de tampão tris-HCL 0,025M (pH 8,8) e 500 microlitros de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 g de tampão Tris-Hcl 0,025 M. A mistura foi incubada a 40°C

durante 2 horas. Ao final desse período adicionou 60 microlitros de HCl 5 M para cessar a reação seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

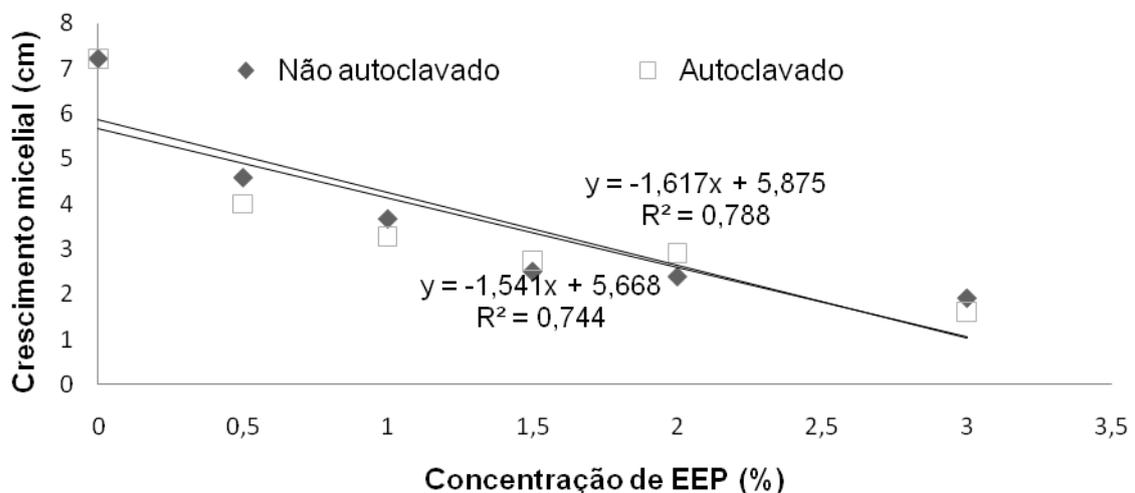
4.6 Análise estatística

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos a análise de variância e análise de regressão com auxílio do programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

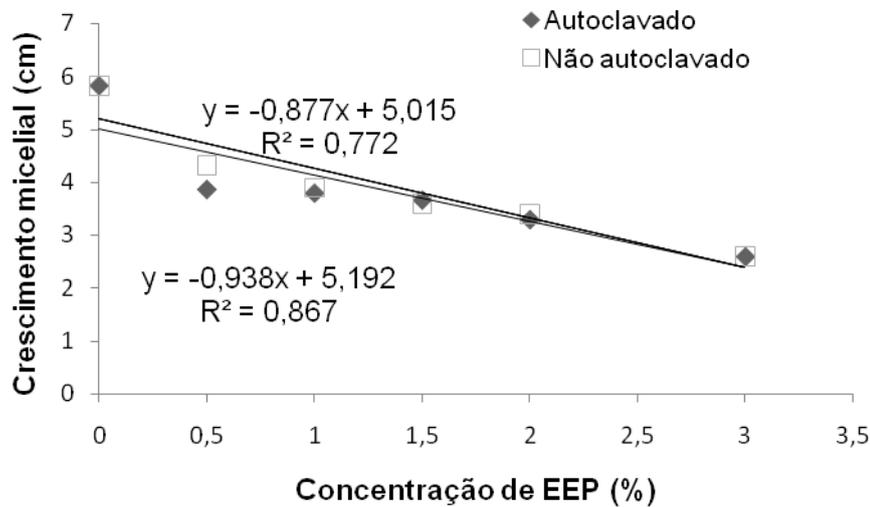
O crescimento micelial de *S. lycopersici* foi reduzido com o aumento na concentração de EEP, com inibição de 78% no crescimento micelial na concentração de 3,0% de EEP autoclavado e 73,33% também na concentração 3,0% não autoclavado comparando com a testemunha (Figura 1). Esse resultado indica efeito antifúngico sobre esse fungo fitopatogênico pelo extrato.

Figura 1- Crescimento micelial de *Septoria lycopersici* com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) autoclavado e não autoclavado



Para o crescimento micelial de *A. solani* o EEP inibiu em 55,4% o crescimento micelial na concentração de 3,0% quando comparado à testemunha (Figura 2), tanto para autoclavado e não autoclavado.

Figura 2. Crescimento micelial de *Alternaria solani* com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP)



Os resultados obtidos mostram o efeito do extrato sobre o crescimento micelial de ambos fitopatógenos e também demonstra o efeito termoestável da própolis, ou seja que mesmo colocado a altas temperaturas manteve-se as propriedades após a autoclavagem. Embora o efeito antimicrobiano da própolis tenha sido mais estudado sobre potenciais patógenos de humanos, alguns trabalhos já tem demonstrado efeito inibitório da própolis também sobre fitopatógenos. Souza et al. (2017) avaliaram extrato etanólico de própolis no controle de *Penicillium* sp. nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% e encontraram inibição, sendo que na concentração de 20% não houve desenvolvimento de fungo. Marini *et al.* (2012) testaram a fungitoxicidade de extratos alcoólicos de própolis sobre o crescimento micelial e esporulação, no qual utilizaram as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 e 1% do extrato, e os autores concluíram que o extrato possui atividade antifúngica *in vitro*, embora baixa para as concentrações testadas, sob a *Phakopsora euvitis*, *Pseudocercospora vitis* e *Elsinoe ampelina*.

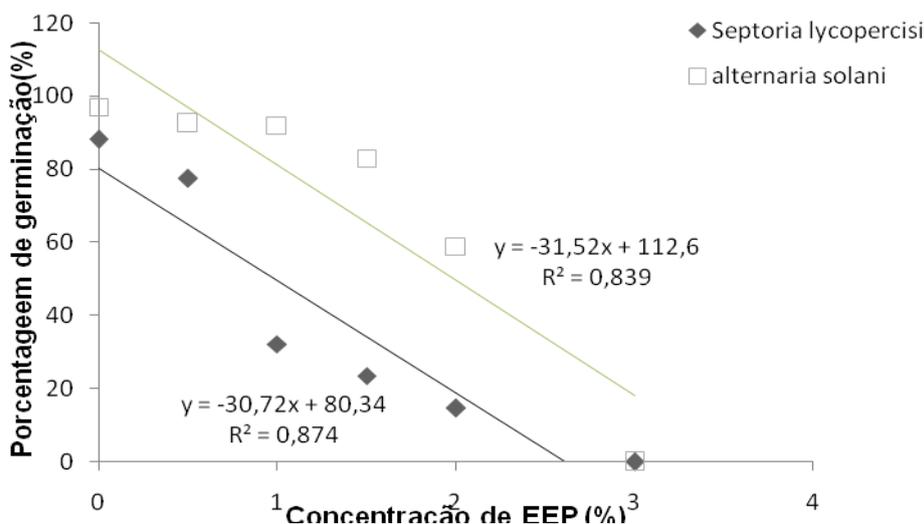
Atividade antifúngica sobre *A. solani* e *S. lycopersici* também já foi relatada por extratos e óleos essenciais de plantas. Almeida, Moura e Franzener (2017), testaram extratos vegetais de gengibre, alho e cravo da Índia no controle da *A. solani* e obtiveram, na concentração 20%, inibição de 37,9, 70,0% para gengibre e alho, respectivamente, sendo que o cravo da Índia promoveu inibição de 100% em todas as concentrações. Tomazoni et al. (2013), em testes realizados *in vitro* com o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* contra os fungos *Alternaria solani*, *Stemphylium solani* e *Septoria lycopersici*, verificaram a inibição do crescimento de

A. solani e *S. solani* a partir da concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ e para *S. lycopersici* a partir da concentração 0,1 $\mu\text{L/mL}$. Neto et al. (2016) também obtiveram resultados satisfatórios quanto a inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici*, utilizando extrato aquoso, óleo essencial e citral provenientes do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), sendo que o óleo essencial e o citral na maior concentração testada (400 μL^{-1}) proporcionaram 100% de inibição, demonstrando potencial alternativa para manejo fitossanitário da cultura do tomate.

Ogbebor e Adekunle (2005) observaram redução tanto no crescimento micelial quanto na germinação de conídios de *C. cassicola*, isolado de seringueira, sob concentrações de extrato bruto (10, 25, 50 e 100%) de *Ocimum basilicum*.

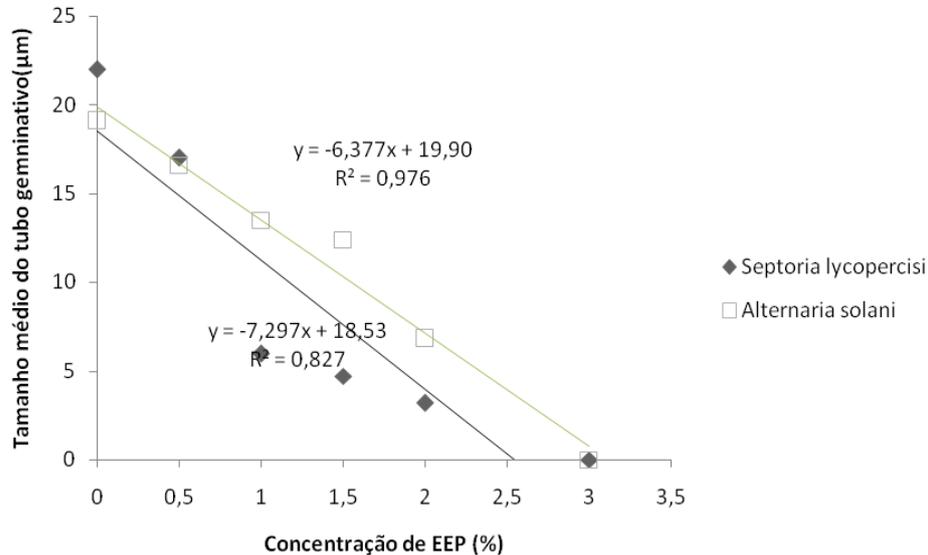
A porcentagem de germinação de esporos de *A. solani* e *S. lycopersici* foi reduzida conforme o aumento da concentração de extrato etanólico de própolis (Figura 3), indicando que o EEP tem efeito direto também sobre a germinação.

Figura 3. Porcentagem de germinação de esporos da *Septoria lycopersici* e *Alternaria solani* por diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) não autoclavados.



Quanto o tamanho médio dos tubos germinativos de *A. solani* e *S. lycopersici*, foi observado resultado semelhante ao da porcentagem de germinação, com maior inibição no tamanho dos tubos germinativos com o aumento na concentração do EEP (Figura 4).

Figura 4. Tamanho médio do tubo germinativo de *Septoria lycopersici* e *Alternaria solani* por diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP)

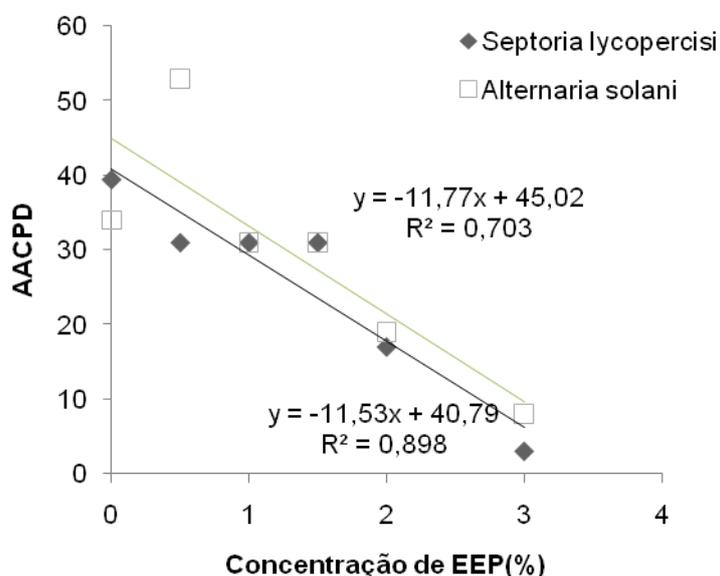


O tratamento de EEP na concentração de 3,0% inibiu o desenvolvimento de ambos os patógenos em 100%, demonstrando o potencial em inibir a germinação e o tamanho dos tubos germinativos. A germinação de esporos e desenvolvimento dos tubos germinativos representam um processo fundamental para infecção do fungo e o estabelecimento da doença.

Balbi-Peña et al. (2006) avaliaram *in vitro* o controle de *Alternaria solani* com extratos de *Curcuma longa* e curcumina e obtiveram 15 % de inibição da germinação dos esporos. No trabalho de Itako et al. (2008) foi avaliada a atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais e encontraram inibição de germinação nos extratos de *A. camphorata* e *C. citratus* e *R. officinales*. Em estudos realizados por Almeida, Camargo e Panizzi (2009) para o controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro, foram testados os extratos de plantas medicinais, das quais arruda, gengibre, vinca, losna, cebola, arnica e nim foram os que propiciaram melhor inibição da germinação dos conídios, diferindo estatisticamente da testemunha.

Quanto a severidade da doença o extrato etanólico de própolis promoveu redução na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com o aumento na concentração do EEP (Figura 5).

Figura 5- Severidade de *Septoria lycopersici* e *Alternaria solani* em folhas de tomate com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP)



A redução na AACPD demonstra o efeito do EEP no controle tanto da pinta preta como da septoriose no tomateiro, pode-se observar redução de 88% da concentração 3,0% em relação a testemunha. Essas são importantes doenças da cultura e a escassez de cultivares com resistência torna o controle ainda mais difícil. Assim, a própolis pode representar uma potencial alternativa no controle dessas doenças.

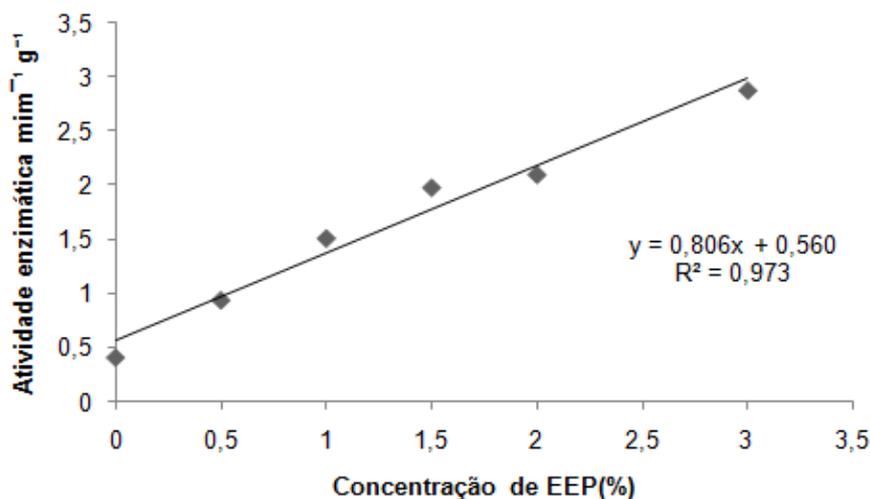
Pereira et al. (2013) ao aplicarem concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5% de extrato etanólico de própolis em mudas de café sob a cercosporiose, concluíram que 1,0; 1,5 e 2,0% do extrato proporcionaram menor incidência da doença. Este mesmo autor destaca três fatores da ação do própolis sobre a cercosporiose. A de possuir nutrientes que possam reduzir a intensidade de doenças; a presença de cera que pode atuar como proteção mecânica e também no efeito indutor de enzimas.

Vieira et al. (2009) testaram duas concentrações de extrato de própolis (0,8 e 1,6%) pulverizando em plantas de pepino para controle do oídio (*Sphaerotheca fuliginea*), obtendo atividade antifúngica na maior concentração.

Pulverizações de extrato de própolis na concentração de 10% foi aplicado em tomateiro com intuito de controlar oídio após o aparecimento dos primeiros sintomas, e os pesquisadores detectaram alta efetividade da própolis, a qual não diferiu do fungicida sistêmico (tebuconazole) (MORAES et al., 2011).

Em relação a peroxidases houve incremento na atividade da enzima com o aumento na concentração do extrato etanólico de própolis (Figura 6).

Figura 6- Atividade de peroxidase nas folhas de tomate tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP).



A atividade de peroxidase está associada a uma variedade de processos relacionados à defesa em plantas, incluindo reações de hipersensibilidade, suberização e lignificação (SILVA et al., 2007).

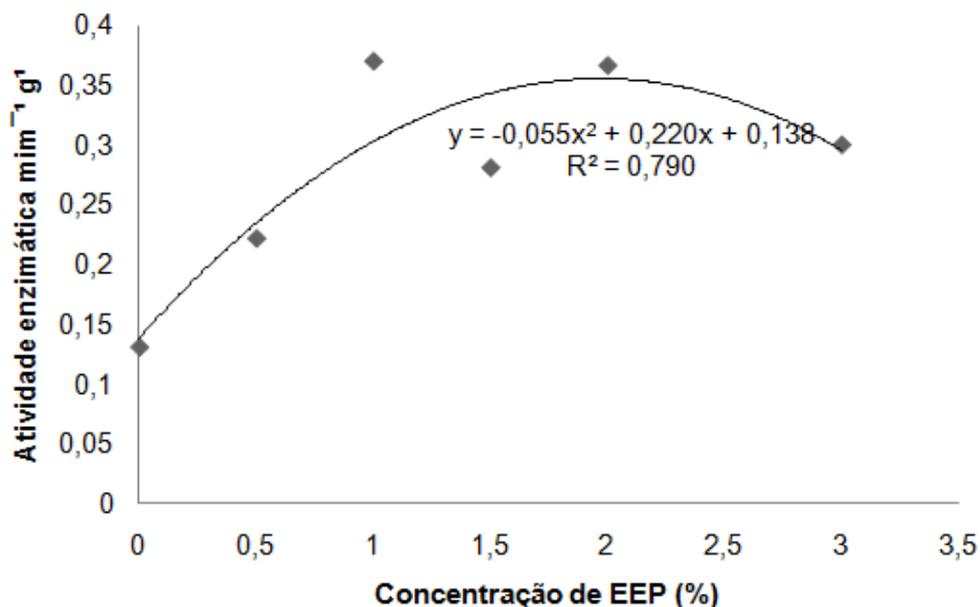
Araujo e Stadnik testam o uso de polissacarídeo ulvana em *Colletotrichum gloeosporioides* em plantas de maçãs, verificaram a indução de resistência pelo aumento na atividade da peroxidase.

Soares, Maringoni e Lima avaliaram a eficiência de Acibenzolar-S-Methyl na indução de resistência de feijoeiro Comum à Murcha-de-Curtobacterium e constataram que a peroxidase apresentou maior atividade nas plantas pulverizadas com o indutor, tanto na folha, como no caule.

Silva, Pascholati e Bedendo (2007) avaliaram a indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sob *Ralstonia solanacearum* e constataram aumentos na atividade de peroxidases, indicando que o cogumelo *L. edodes* e o indutor abiótico ASM apresentam potencial para reduzir a murcha bacteriana provavelmente através da indução de resistência.

Em relação a polifenoloxidase houve incremento da enzima até certo ponto e após decresceu como mostra a Figura 7.

Figura 7- Atividade de polifenoloxidase em folhas de tomate tratadas com diferentes concentrações de EEP.

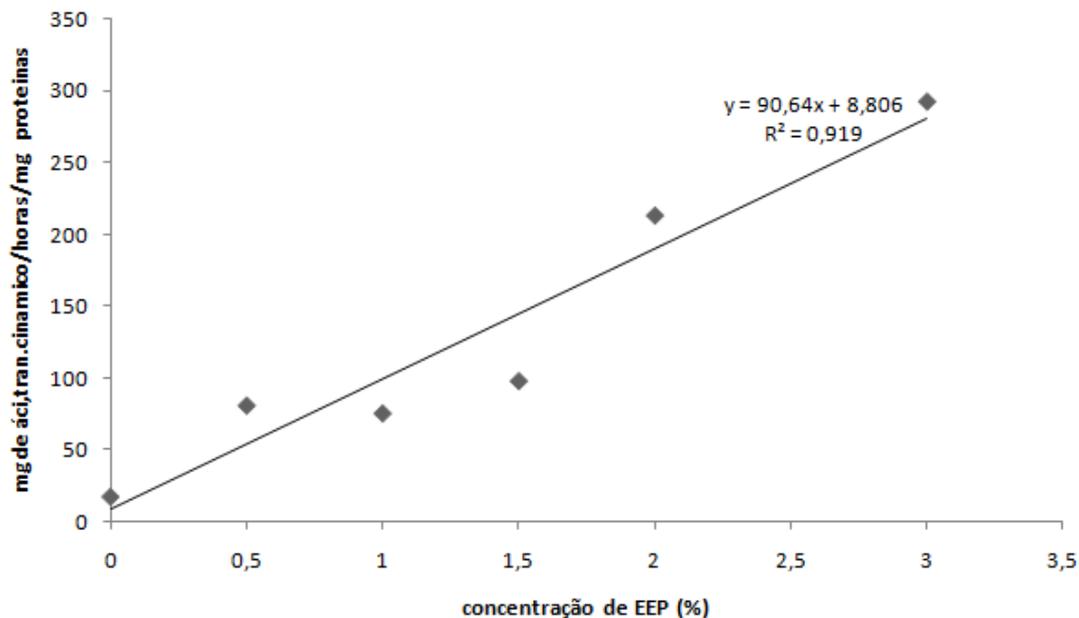


De acordo com a equação quadrática o ponto de máxima atividade da enzima foi na concentração de 2,0%. A importância da atividade da polifenoloxidase na resistência a doenças, de acordo com Campos et al. (2004), possivelmente tem relação com sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, sendo estes mais tóxicos aos microrganismos e também sua ação protetora no local do ferimento. Neste contexto os autores constataram maior atividade da polifenoloxidase em tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas sadias.

Andrade et al. (2013) avaliaram indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa e constataram que a atividade de peroxidases, polifenoloxidase foi maior para o ácido jasmônico em comparação com o controle.

Em relação a fenilalanina amônia-liase também houve incremento na atividade da enzima com o aumento da concentração de EEP (Figura 8).

Figura 8. Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de tomate tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP)



A ativação da FAL pelo EEP é uma informação de grande importância uma vez que essa enzima tem papel fundamental na ligação entre o metabolismo primário e o secundário, podendo desencadear a formação de diversos compostos de importância para defesa vegetal. É também precursora da rota dos fenilpropanóides originando diversos outros compostos originados a partir do ácido benzóico, cumarinas, precursores de lignina, amônia e demais outros, utilizados pelas plantas para sua defesa (FORMENTINI, 2012).

Ainda há poucas informações no potencial da própolis na indução de FAL, mas estudos com outros produtos naturais, como extratos vegetais e óleos essenciais tem demonstrado efeito na indução dessa enzima e no controle de doenças. Piva (2013) ao trabalhar com extrato de própolis e de canola no controle de oídio em pepino ao fazer uso do extrato preparado por maceração verificou o aumento da FAL nos tempos de 72 h e 144 h. Os resultados obtidos pelo EEP no aumento da atividade de FAL como de outras enzimas relacionadas a defesa vegetal indicam o possível efeito indutor de resistência do EEP em plantas de tomateiro.

6. CONCLUSÃO

O extrato etanólico de própolis teve efeito inibitório direto sobre o crescimento micelial, tanto nos tratamentos autoclavados e não autoclavados e também na germinação de esporos e tamanho médio dos tubo germinativos de *A. solani* e *S. lycopersici*, com maior efeito nas maiores concentrações não autoclavados utilizadas.

O EEP reduziu a severidade da pinta preta e a septoriose em plantas de tomateiro.

O EEP também houve tendência no aumento da atividade das enzimas de peroxidase, fenilalanina amônio-lias, com exceção da polifenoloxidase, demonstrando o potencial em ativar mecanismos bioquímicos relacionados a defesa do tomateiro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. F., CAMARGO, M., PANIZZI, R. C. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.196-201, 2009.

ALMEIDA, E.N.; MOURA, G.S.; FRANZENER,G. Potenciais alternativas com extratos vegetais no controle da pinta preta do tomateiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2017.

ALVARENGA, M.A.R. **Exigências Climáticas**. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.).**Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: Ed. Da UFLA, 2004. p. 31-36.

BALBI-PEÑA,M.I et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.310-314. 2006.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.

BETTIOL,W. **Controle biológico de doenças de plantas**.Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA,1991.388p.(documentos,15).

CAMARGO, F. P. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.11, nov. 2006.

CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, E.M.L. **Metodologia para determinação da peroxidase**

e da polifenoloxidase. EMBRAPA, Pelotas-RS,2004. NO TEXTO ESTÁ 2004

CARNEIRO, S.M.T.P.G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.3, p.262-265, 2003.

DI PIERO, R.M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Siitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos.** Tese de Doutorado, p.129. São Paulo, 2003.

FAO. FAOSTAT 2016. Disponível em:

<<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD> >. Acesso em: 17/06/17.

FÁVARIS, N. A. B.; et al. Qualidade fisiológica de genótipos de tomate fertilizados com lodo de esgoto. **Nucleus**, v.13, n.2, p.231-240, 2016.

FERREIRA, E.F. **Uso de extrato vegetais no controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamoeiro (*Carica papaya*).** Dissertação. Vitória da conquista, 2013.

FRANZENER, G. et al. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, jan./mar. 2007.

FILHO A.M.F. et al. Controle da pinta preta (*Alternaria solani*) por meio de fungicidas na cultura do tomate. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.S2922-S2926, 2008.

IBGE. Produção da safra de tomate. 2015. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/estatisticas_previsao_safra/default.shtm >acesso em 17/06/17.

ITAKO, A.T.; et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, vo. 33, 3, 241-244, 2008.

JONES, J.B. et al. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: 2016

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 2005

LOPES; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 1994

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da pinta preta do tomateiro**. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Curso de Pósgraduação em Agronomia/Fitopatologia, Lavras, 2012.

MARINI, D. et al. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.2, p.305-308, 2012.

MORAES, W. B. et al. Aplicação foliar de fungicidas e produtos alternativos reduz a severidade do oídio do tomateiro. **Revista Nucleus**, v. 8, n. 2, p.57-68, 2011.

MURATA, M. et al. Expression and Induction of Polyphenol Oxidase in Apple (*Malus pumila*) Cell Culture. *Bioscience, Biotechnology e Biochemistry*, Tokyo, 59, n. 8, p. 1472-1476, 1995.

OLIVEIRA, M.D.M. et al. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, v.15, p.152-158, 2016.

OGBEBOR, N.; ADEKUNLE, A.T. Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) using extracts of some plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.996-1000, 2005.

PEREIRA, F. D. M., et al. **Produção de mel**. Embrapa Meio-Norte - Sistema de Produção, v. 3, p. 2002.

PEREIRA, S.C.; et al. Controle da cercosporiose e da ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 5, p. 369-376. 2008.

PEREIRA, R.B. **Recomendações para o manejo da septoriose em tomateiro**. Comunicado Técnico 96. Embrapa Hortaliças. 2013.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C.A. **Mancha-de-septória**: doença limitante do tomateiro no período de chuvas. Brasília: EMBRAPA, 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**, v.32, p189-196, 2007.

SILVEIRA,H.S.S.; ZAMBOLIM,L.; JESUS JUNIOR,W.C. Manejo da requeima do tomateiro industrial empregando sistema de previsão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 328-334, 2007.

SOUZA,E.P. et al. Extrato etanólico de própolis no controle do *Penicillium sp.* e na qualidade de sementes de couve flor. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering** v.11, n.2, p.135-141, 2017.

SOARES, R.M.;MARINGONI,A.C.;LIMA,G.P.P Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.373-377, 2004.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. et al., Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.265-304, 2008.

TOMAZONI, E. Z. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: VIII Congresso Brasileiro De Agroecologia, 2013, Porto Alegre. Anais eletrônicos. Porto Alegre: Universidade de Caxias do Sul: 2013. Disponível

em:

<

www.abaagroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/download/13846/9464>.a

cesso em 16 de junho de 2018.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**. 2004.

VIEIRA; G.H.C.; ANDRADE, W.P. Efeito fungicida de produtos alternativos no controle de oídio em pepineiro. **Omnia Exatas**, Adamantina. v. 2, n. 2, p.45-49, 2009.

ZAMBOLIN, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds). **Controle de doenças de plantas de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2000.

ZHANG, S. et al. Enhancement of Phenylalanine Ammonia Lyase Polyphenoloxidase, and Peroxidase in Cucumber Seedlings by *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera Aleyrodidae) Infestation. **Agricultural Sciences in China**, v.7, n.1, p.82-87, 2008.