



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL

CURSO DE AGRONOMIA

MARCOS PAULO BERTOLINI DA SILVA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE TOMATE POR MEIO DO
TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus* spp.**

LARANJEIRAS DO SUL

2019

MARCOS PAULO BERTOLINI DA SILVA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE TOMATE POR MEIO DO
TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus spp.***

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
2019**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Silva, Marcos Paulo Bertolini da
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE TOMATE POR
MEIO DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE
Citrus spp. / Marcos Paulo Bertolini da Silva. -- 2019.
26 f.:il.

Orientador: Doutor Gilmar Franzener.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR , 2019.

1. Indução de resistência. 2. Tratamento de sementes.
I. Franzener, Gilmar, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARCOS PAULO BERTOLINI DA SILVA

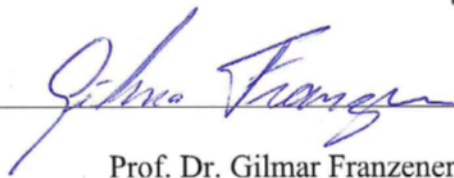
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE TOMATE POR MEIO DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus* spp.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul (PR)

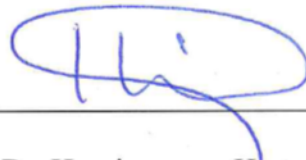
Orientador: Prof. Gilmar Franzener

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 03/12/2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gilmar Franzener



Prof. Dr. Henrique von Hertwig Bittencourt



Dra. Gabriela Silva Moura

Este trabalho de Conclusão de Curso foi redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Agropecuária sustentável que constam no anexo A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A. Atividade da enzima peroxidase em parte aérea de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais	15
Figura 1 B. Atividade da enzima peroxidase em parte radicular de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais.....	16
Figura 2A. Atividade da enzima polifenoloxidase em parte aérea após o tratamento com os óleos essenciais.....	18
Figura 2B. Atividade da enzima polifenoloxidase em parte radicular após o tratamento com os óleos essenciais.....	18
Figura 3A. Atividade de Fenilalanina amônia-liase em parte aérea de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais.....	19
Figura 3B. Atividade de Fenilalanina amônia-liase em parte aérea de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais.....	20

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE TOMATE POR MEIO DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus* spp.

O tomate está entre as hortaliças mais produzidas e consumidas no país, tendo grande importância econômica. O ataque de pragas e doenças causa perdas e o controle comumente é realizado com substâncias sintéticas. Buscando a adoção de técnicas de menor impacto ambiental assume importância a indução de resistência em plantas por produtos naturais. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do tratamento de sementes com óleos essenciais de *Citrus* spp. na indução de resistência de plântulas de tomate. O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da UFFS *campus* Laranjeiras do Sul. Utilizou-se sementes de tomateiro cv. Gaúcho que foram tratadas a 0,5% de óleo essencial de *Citrus sinensis* e *Citrus lemon* e a testemunha com água, ambos, o tratamento e a testemunha adicionou-se 0,1% de Tween 20. Foram coletadas plântulas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a semeadura (DAS), utilizou-se de 4 repetições constituídas de 8 plântulas, separadas em parte aérea e radicular. O material vegetal foi armazenado a -20°C até as análises bioquímicas. Determinou-se o teor de proteínas totais e a atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. Observou-se que o teor de proteínas totais em parte aérea foi menor no tratamento com *C. sinensis* aos 5 a 20 DAS. Para peroxidase e polifenoloxidase observou-se atividade crescente no decorrer dos dias, estando mais relacionada com o desenvolvimento das plântulas e não com os óleos essenciais. Em fenilalanina amônia-liase obteve-se maior atividade aos 25 dias no tratamento com *C. sinensis* e *C. lemon*, tanto em parte aérea quanto radicular. Os resultados evidenciam efeito indutor de resistência do óleo essencial de *Citrus* spp. em plântulas de tomate pelo tratamento da semente com os óleos essenciais, bem como a importância de estudos complementares para aumentar a compreensão da interação.

Palavras-chave: Patógenos, parte aérea, enzimas, proteínas totais

RESISTANCE INDUCTION IN TOMATO SEEDLINGS THROUGH SEED TREATMENT WITH ESSENTIAL OILS OF *Citrus* spp.

ABSTRACT

Tomato is among the most produced and consumed vegetables in the country, having great economic importance. Pest and disease attacks cause losses and control is commonly performed with synthetic substances. Seeking the adoption of techniques of lower environmental impact assumes the induction of resistance in plants by natural products. The present work aimed to evaluate the influence of seed treatment with essential oils of *Citrus* spp. resistance induction of tomato seedlings. This study was carried out at the Phytopathology Laboratory of UFFS campus Laranjeiras do Sul. It used tomato seeds cv. Gaúcho which were treated with 0.5% *Citrus sinensis* and *Citrus lemon* essential oil and the control with water, to both, the treatment and the control were added 0.1% Tween 20. Seedlings were collected at 5, 10, 15, 20 and 25 days after sowing (DAS), we used 4 replications consisting of 8 seedlings, separated in aerial part and root. Plant material was stored at -20 °C until biochemical analysis. Total protein content and activity of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase were determined. It was observed that the total protein content in aerial part was lower than in *C. sinensis* treatment at 5 to 20 DAS. For peroxidase and polyphenoloxidase, increasing activity was observed over the days, being more related to seedling development and not to essential oils. Phenylalanine ammonia-lyase showed higher activity at 25 days in the treatment with *C. sinensis* and *C. lemon*, both in aerial part and root. The results show resistance inducing effect of the essential oil of *Citrus* spp. in tomato seedlings by seed treatment with the essential oils, as well as the importance of complementary studies to increase the understanding of the interaction.

Keyword: Pathogens, aerial part, enzymes, total proteins

1. SUMÁRIO

2. INTRODUÇÃO.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÕES	21
6. REFERÊNCIAS	22
7. ANEXO A	25

2. INTRODUÇÃO

O tomate é uma das hortaliças mais consumidas e produzidas no Brasil, sendo que no ano de 2017 foram produzidos 44, 259 toneladas do tipo mesa (IBGE, 2019). O aumento da demanda pelos consumidores faz com que o monocultivo seja priorizado e com isso inúmeras doenças e pragas acometem a cultura, ocasionando impactos ambientais e econômicos advindos da necessidade de intervenção e manejo.

O controle destes organismos é um grande gargalo para o processo produtivo, pois ainda não há resistência genética na cultura para a maioria das doenças que ocorrem durante o ciclo (Lopes & Reis, 2011). Segundo Pereira, Ferreira & Pinheiro (2013) a ocorrência de fitopatógenos no tomate pode representar uma ameaça a produção esperada, pois além de danificar tecidos importantes podem ainda comprometer diretamente a qualidade do produto final. Uma importante ferramenta para auxiliar na diminuição do ataque é a utilização do tratamento de sementes (Lopes & Ávila, 2005), que na maioria das vezes é realizado com a utilização de produtos químicos que podem representar riscos à saúde de quem aplica e do consumidor final (Isman, 2006).

Devido a isso surge a necessidade de buscar alternativas aos produtos sintéticos e nessa perspectiva os extratos vegetais, óleos essenciais e pós estão sendo avaliados com a finalidade de reduzir danos e aumentar ganhos. Os óleos essenciais são produzidos no metabolismo secundário das plantas e podem atuar de diversas formas (Okoh, 2010). Esses produtos tem se mostrado promissores devido a suas propriedades antifúngicas e natureza biodegradável (Kricsh, et al., 2011; Sarto & Zanusso Jr, 2014). Além disso de acordo com Daferrera et al., (2003), os óleos essenciais apresentam uma grande quantidade de compostos que atuam de diferentes formas reduzindo a ocorrência de patógenos resistentes ou ainda atuando sobre diferentes mecanismos de indução de resistência em plantas.

Na família Rutaceae, o gênero *Citrus* é um dos mais cultivados e possui uma grande diversidade devido ao comércio dos frutos *in natura* ou em forma de sucos (Guimarães et al. 2010). Além disso, plantas deste gênero produzem óleos essenciais que possuem capacidade antimicrobiana (Cavalcanti et al., 2012). A composição química dos óleos pode variar de acordo com as condições ambientais e de cultivo das plantas, com destaque para o limoneno e o linalol (Teixeira, Marques & Figueiredo, 2013; Silva et al., 2013; Santos et al., 2016).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na área de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, porém pouco se sabe sobre sua eficiência na indução de resistência de plantas. Durante o período evolutivo as plantas desenvolveram em seu metabolismo um sistema de defesa latente que é ativado quando expostas a algum agente externo podendo este ser infectante ou algum produto utilizado em aplicações (Bettiol & Stadnik 2001; Kuhn, 2007;). Algumas dessas moléculas, com potencial de induzir a resistência nas plantas são denominadas elicitores ou eliciadores, que ativam mecanismos de defesa.

Uma vez ativados, esses mecanismos atuam com sinais químicos para a síntese de enzimas do sistema de defesa. Todavia pouco se sabe sobre a influência do tratamento de sementes com óleos essenciais de *Citrus* spp sobre a indução de resistência em as plântulas de tomate. Diante disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência do tratamento de sementes com óleos essenciais de *Citrus lemon* e *Citrus sinensis* sobre a produção de proteínas, e a atividade das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase em plântulas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da UFFS *campus* Laranjeiras do Sul, PR com sementes de tomate cv. Gaúcho sem tratamento adquiridos no

mercado local e óleo essencial de de *Citrus sinensis* e *C. lemon*.

As sementes de tomate foram inicialmente desinfestadas superficialmente com NaClO a 0,5% por 2 min. Após secagem foram tratados com os óleos essenciais (com 0,1% de tween 20) de *C. sinensis* e *C. lemon* na concentração de 0,5% por 2 min e a testemunha tratada apenas com água destilada e tween 20.

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial para produção de mudas. Foi realizada a coleta da parte aérea e parte radicular aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a semeadura (DAS), sendo cada amostra pesada para se obter o peso de massa fresca de cada repetição e então foram armazenadas em freezer a -20 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição representada por 8 plântulas.

Para realização das análises bioquímicas, as amostras foram maceradas com almofariz e pistilo, acrescidas de 2 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0), e 1% de PVP (polivinil-pirrolidona) e então centrifugadas a 14.500 g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato enzimático. Quantificou-se espectrofotometricamente o conteúdo de proteínas totais, peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

Para a quantificação do conteúdo de proteínas totais utilizou-se a metodologia de Bradford (1976), onde foram homogeneizados 600 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 µL do extrato enzimático e 200 µL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) e 125 mL de água destilada). A determinação foi feita pela leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro, sendo cada amostra formada por três réplicas e cubeta de referência utilizada foi a de 800 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 µL do reagente e os resultados foram expressos em mg proteína mL⁻¹.

A atividade de peroxidases foi determinada pela medida da conversão do guaiacol

em tetraguaiacol (Lusso & Pascholatti, 1999), a 470 nm, sendo a mistura constituída de 0,2 mL de extrato proteico e 2,8 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio P.A., 12,5 mL de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), conduzida a 30°C por 1 min. Para polifenoloxidase mediu-se a oxidação do catecol em quinona por 1 minuto a 420 nm (Duangmal & Apenten, 1999).

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela metodologia descrita por Umesha (2006), onde a atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 µL de extrato enzimático e 900 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico e expressa em mg de ácido trans-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹.

Os resultados foram submetidos à análise de variância seguidos de análise de regressão para as concentrações de óleo essencial de *Citrus* spp utilizadas e teste de comparação múltipla de médias de Tukey a 5% de probabilidade para os dados qualitativos e a análise de regressão para a atividade enzimática. As análises foram realizadas com auxílio do programa computacional Sisvar (Ferreira, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *C. sinensis* promoveu menor teor de proteína nos tempos de 5 a 15 dias após a semeadura, com equivalência aos demais aos 25 dias (Tabela 1). O OE de *C. sinensis* não diferenciou da testemunha nos diferentes tempos de amostragem. Esse efeito negativo do OE de *C. sinensis* no teor de proteínas na fase inicial do desenvolvimento das plântulas pode ser devido a um possível efeito fitotóxico.

Tabela 1. Quantificação dos teores de proteínas totais em parte aérea e radicular em mg mL⁻¹ de amostra.

Tratamentos	Dias após a semeadura				
	5	10	15	20	25
Parte aérea (mg mL ⁻¹)					
<i>Citrus sinensis</i>	1.57 Aa	1.43 Aa	1.44 Aa	2.38 Ab	2.50 Ab
<i>Citrus lemon</i>	2.72 Ba	2.85 Ba	2.70 Ba	2.87 Ba	2.82 Aa
Testemunha	2.75 Ba	2.84 Ba	2.78 Ba	2.72 ABa	2.72 Aa
Parte radicular (mg mL ⁻¹)					
<i>Citrus sinensis</i>	2.75 Aa	2.67 Aa	2.83 Ba	2.75 Ba	2.68 Aa
<i>Citrus lemon</i>	2.73 Aa	2.64 Aa	2.71 Aba	2.58 ABa	2.66 Aa
Testemunha	2.69 Aa	2.60 Aa	2.57 Aa	2.55 Aa	2.58 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação a parte radicular observa-se aumento significativo aos 15 e 20 dias no tratamento com *C. sinensis*, sendo que *C. lemon* não diferiu da testemunha.

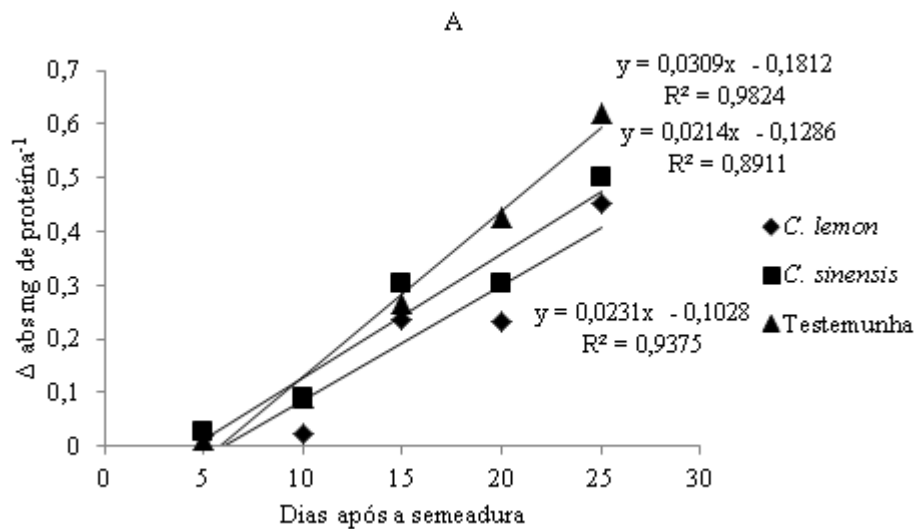
As proteínas estão envolvidas em diversos processos metabólicos dentro da planta, inclusive o enzimático, sua quantificação é importante principalmente por plantas infectadas por patógenos geralmente apresentarem maior atividade de proteogênese (Van Lonn, 1997). Além disso o estímulo externo por meio dos elicitores faz com que as proteínas do tipo PR, que são as que atuam nos mecanismos de defesa vegetal sejam sintetizadas (Espíndola et al., 2017).

Segundo Almeida et al. (2012) há maior proteogênese quando ocorre maior atividade de resistência, mostrando nesse caso que o tratamento com o objetivo de induzir resistência deveria apresentar dados maiores do que os encontrados na testemunha. Estudos

realizados por Vigo et al. (2009) sobre plantas de feijão com aplicação mostraram que os tratamentos com óleos essenciais não influenciaram nos teores finais de proteínas, assim como os mostrados neste trabalho.

Para enzima peroxidase houve aumento na atividade tanto parte aérea (Figura 1A) como na parte radicular (Figura 1B) com o aumento no número de dias após a semeadura.

Houve diminuição na atividade enzimática nos tratamento contendo os óleos essenciais, sendo que em *C. sisnensis* ocorreu menor atividade da enzima. Também observa-se que a maior atividade da enzima ocorreu aos 25 dias para todos os tratamentos, indicando também que sua atividade está mais relacionada com o desenvolvimento da planta do que com a indução pelos tratamentos.



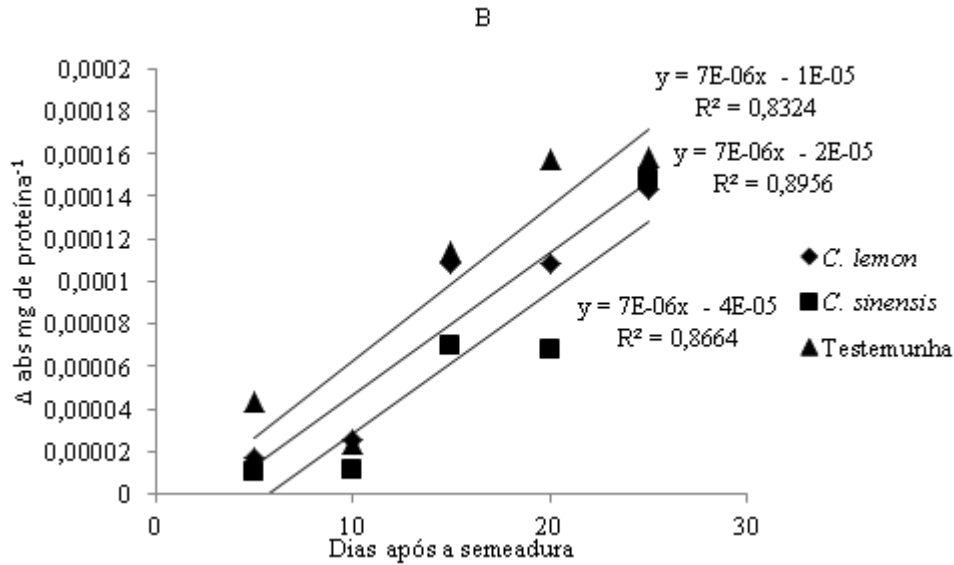


Figura 1. Atividade da enzima peroxidase em parte aérea (A) e parte radicular (B) de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais

A quantificação da ação da peroxidase se dá pela sua ação catalisando reações de oxidação do guaiacol que leva a polimerização de monômeros e hidroxicinamil álcool, fazendo com que ocorra a formação de lignina levando ao endurecimento da parede celular vegetal e devido a isso maior resistência à penetração de patógenos (Hiraga et al., 2001; Campos & Silveira, 2003).

Em trabalho realizado com Pereira et al., (2008), utilizando óleo essencial de tomilho houveram picos de atividade da enzima, porém menores do que os foram encontrados com a utilização de outros elicitores. Steffen et al., (2007), também observou diminuição na atividade da enzima em plantas de arroz submetidos ao tratamento de óleos essenciais de plantas medicinais. Carlos et al., (2010), observou que não houve aumento da atividade da enzima em plantas de pepino quando tratadas com óleos essenciais de *Achillea millefolium*, segundo o autor este efeito pode estar relacionado à resposta rápida da planta ao elicitador, fazendo com que quantificações com intervalo de tempo maior não detectem a atividade da enzima. Freddo et al., (2016) observou que o tratamento de sementes com óleo essencial de *Aloysia citriodora* na concentração de até 0,24% elevou a atividade de

peroxidase. Podendo desta forma o resultado encontrado para esta enzima estar relacionado com a dose e o intervalo após o tratamento e a primeira análise.

De maneira geral observa-se que para atividade de polifenoloxidasas houve aumento no decorrer dos dias, porém a atividade foi menor nos tratamentos utilizando os óleos essenciais do que na testemunha, sobretudo como o aumento no número de dias após a semeadura. Esses resultados indicam um possível efeito inibitório de polifenoloxidasas por esses óleos essenciais nas plântulas, tanto em parte aérea (Fig. 2A) como radicular (Fig. 2B).

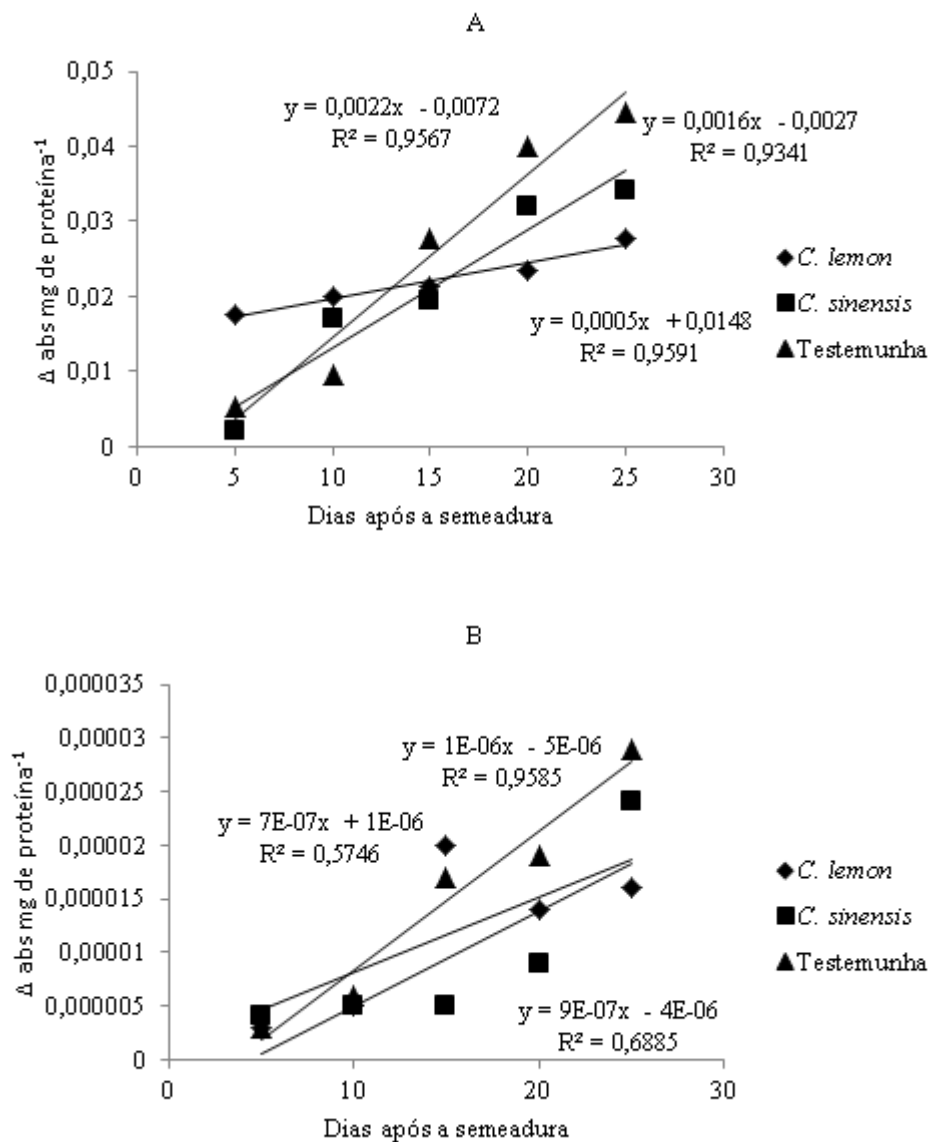


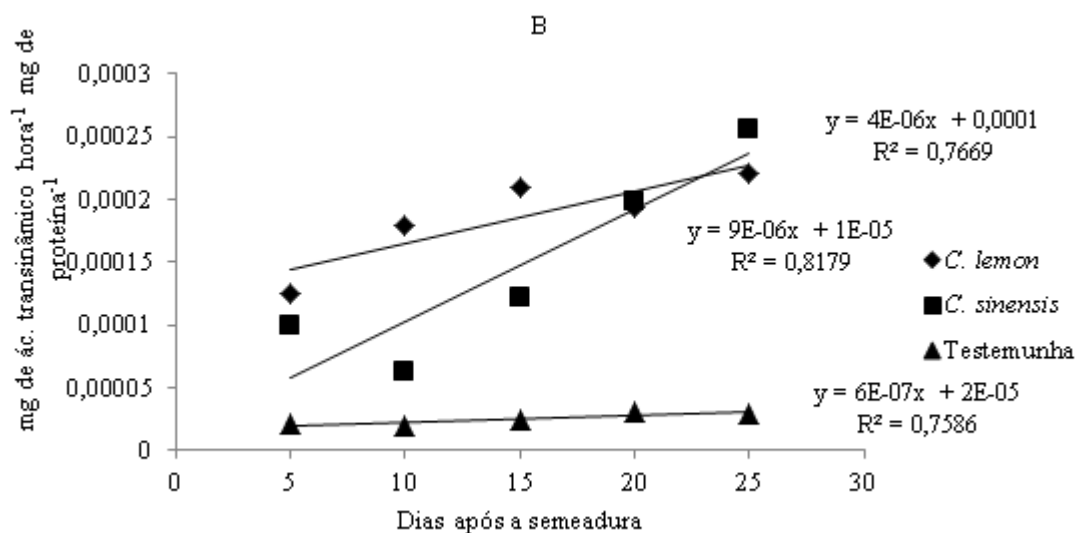
Figura 2. Atividade da enzima polifenoloxidase em parte aérea (A) e radicular (B) de

plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais.

A polifenoloxidase, atua na transformação em reações de hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e posteriormente na oxidação destes para quinonas e polímeros e ambos atuam como barreira para a penetração de patógenos (Campos & Silveira, 2003).

Rodrigues et al., (2019), observou que no tratamento de bagas de uva com óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Eugenia uniflora* e *Cacearia sylvestris* houve diminuição na atividade da enzima polifenoloxidase. Em trabalho realizado por Hedges et al., (2019) com a aplicação de óleo essencial de *Citrus aurantium* observou-se um incremento da atividade da enzima. Pietrobelli et al. (2017) houve maior ativação da enzima polifenoloxidase em plantas tratadas com *C. sinensis*, porém menor do que os tratamentos com outros óleos essenciais.

A concentração de ácido transcinâmico, representando a atividade da enzima fenilalanina amônia liase, diferiu entre os tratamentos no tempo, com a testemunha apresentando as menores concentrações à partir dos 10 dias após a semeadura na parte aérea (Figura 3 A) e em todo o período avaliado no sistema radicular (Figura 3 B).



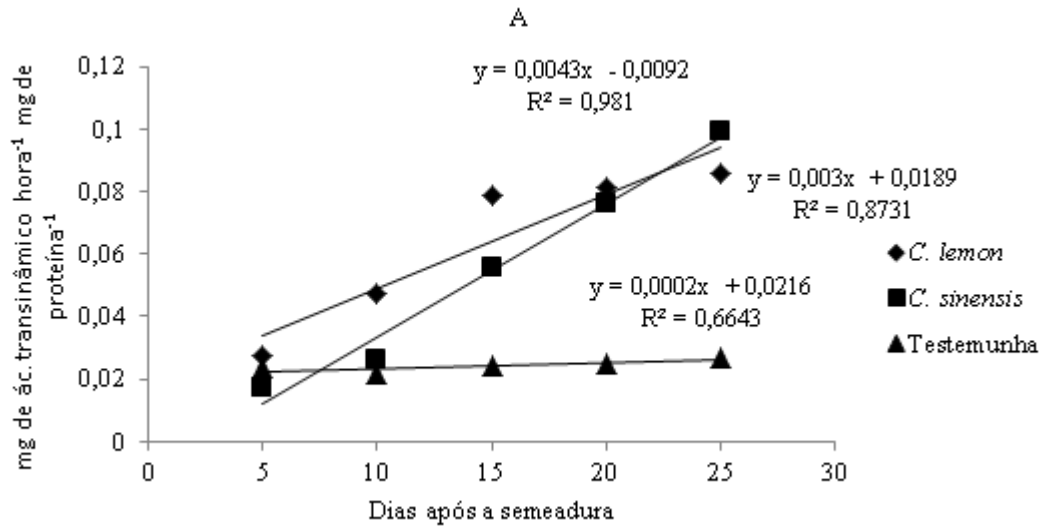


Figura 3. Atividade de Fenilalanina amônia-liase em parte aérea (3 A) e radicular (3 B) de plântulas de tomateiro após o tratamento com os óleos essenciais.

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) também é uma enzima que atua no sistema de defesa vegetal catalisando reações de desaminação da fenilalanina em ácido-transinâmico ligado à síntese de lignina que confere maior resistência a parede celular (Dixon & Paiva 1995; Monteiro, Pereira & Abreu 2004).

Conforme a figura 6 observa-se que o comportamento da enzima dentro dos tratamentos foi distinto do encontrado nas demais enzimas. Os óleos essenciais de *Citrus sinensis* e *C. lemon* promoveram aumento linear na atividade da enzima, tanto na parte aérea como na parte radicular das plântulas. Esses resultados demonstram que o tratamento de sementes com esses óleos essenciais podem promover alterações bioquímicas em respostas de defesa das plântulas, principalmente pela importância dessa enzima em mecanismos de defesa vegetal.

Silva et al., (2007) observaram que bananeiras tratadas com óleos essenciais ocorreu aumento na atividade da enzima nos diferentes tempos de coleta de tecido para análise após o tratamento. Hilmann et al., (2015) verificou que o tratamento de sementes de tomateiro por volatilização com óleo essencial de pitanga e tomilho promoveu maior atividade da

enzima. Em trabalho realizado por Lorenzetti et al., (2018), em plantas de soja que foram tratadas após a germinação com extrato bruto de *Rosmarinus officinalis L.* que houve um aumento de FAL quando tratada com na concentração de 5%. Freddo et al., (2016) em tratamento de sementes de pepino com óleo essencial de *Aloysia citriodora* nas concentrações de 0,06; 0,12 e 0,25 % observou aumento da atividade de FAL em todas as concentrações.

5. CONCLUSÕES

Houve diminuição nos teores de proteínas totais em parte aérea de plantas tratadas com *C. sinensis* entre 5 e 15 DAS e incremento em raízes aos 15 e 20 DAS.

Os óleos essenciais não promoveram incremento na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase tanto em parte aérea quanto radicular em relação a testemunha, estando seu aumento relacionado ao desenvolvimento das plântulas no decorrer do período, uma vez que esse efeito foi observado em todos os tratamentos.

Os óleos essenciais de *C. sinensis* e *C. lemon* promoveram aumento linear na atividade de fenilalanina amônia-liase, tanto em parte aérea como radicular de plântulas pelo tratamento de sementes.

Estes resultados evicenciam a necessidade de mais estudos voltados para indução de resistência de plantas por meio do tratamento de sementes.

6. REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W.; STADNIK, M. J. 2001. *Controle alternativo de Oídios*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 165-192.
- BRADFORD, M.A. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, L. M. L.; *Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas*. Comunicado Técnico 87. Pelotas-RS. 3 p. 2003
- CARLOS, M. M. *Efeito de extrato bruto e óleo essencial de achillea millefolium em desenvolvimento in vitro de corynespora cassiicola e proteção de pepino à mancha de corinespora*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, p.309-316, 2010
- CAVALCANTI, Y. W. et al. *Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de Candida*. Revista brasileira de Ciências da Saúde vol. 16, p.43-48, 2012
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. The effectiveness of plant essential Oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter Michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39–44, 2003.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. *Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism*. The Plant Cell, Vol. 7, 1085-1097 p. 1995
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. *A comparative study of polyphenoloxidases from taro (Colocasia esculenta) and potato (Solanum tuberosum var. Romano)*. Food Chemistry, v.64, p.351-359, 1999.
- ESPÍNDOLA, B. P. *Indução de resistência e vaporização de óleos essenciais no controle de podridões pós-colheita em pêssegos Chimarrita*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Lages, SC: UDESC, 2017. 84 p.
- FERREIRA, D. F. *SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 5.0*. Lavras: DEX/UFLA, 2007. CD-ROM. Software.
- LOPES, C. A.; ÁVILA, C. *Doenças do Tomateiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2005. 151 p.
- GUIMARÃES R, *Targeting excessive free radicals with peels and juices of Citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange*. Food Chem Toxicol v.48, p: 99 – 106, 2010.
- HENDGES, C. *Atividade antifúngica, controle da pinta preta e ativação de mecanismos de defesa em tomateiro por óleos essenciais*. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Marechal Cândido Rondon, PR: UNIOESTE, 2019. 81 p.
- HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H.; *A large family of class III plant peroxidases*. Plant and Cell Physiology, v.42: p.462-468, 2001.
- IBGE, Pesquisa agrícola municipal. 2017 In:<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6953#resultado> (acessado em 02 de novembro de 2019).

ISMAN, B. M. *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. Annu. Rev. Entomol.51:45-66. 2006

KRISCH, J., TSERENNADMID, R., VAGVÖLGYI, C. *Essential oils against yeasts and moulds spoilage*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Formatex Research Center. v.2, p. 1135–1142, 2011.

KUHN, O. J. *Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris), por acibenzolar-S-metil e Bacillus cereus: Aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção*. Tese (Doutorado em Agronomia) Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2007. 138 p.

LOPES, C. A.; REIS, A. *Doenças do Tomateiro Cultivado em Ambiente Protegido*. Embrapa Hortaliças. 2011. 2ª ed.17 p.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. *Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation*. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.25, p.244-249, 1999.

LORENZETTI, E. et al., *Indução de resistência à Macrophomina phaseolina em soja tratada com extrato de alecrim*. Summa Phytopathol v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

MONTEIRO, M. B. O.; PEREIRA, R. P. W.; SANTOS, H. S. *Bioquímica da lignificação de células xilemáticas*. Revista Florestas e Ambiente v. 11, p. 48 - 57, 2004

OKOH, O. O. *Chemical transformations and phytochemical studies of bioactive componentes from extracts of Rosmarinus officinalis L*. 2010. 198 f. Dissertação (doutorado em filosofia) – Faculdade de Ciências e Agricultura na Universidade de Fort Hare, Fort Hare, 2010

PIETROBELLI, R. S. *Óleos essenciais de espécies cítricas no controle da ferrugem asiática (Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & P. Sydow) DA SOJA (Glycine max (L.) (Merrill))*. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Laranjeiras do Sul, PR: UFFS, 2017. 49 p.

PINHEIRO, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. *Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, cucurbitáceas e cenoura*. Circular técnica 121, Brasília-DF, 16 p. 2013.

RODRIGUES, J. D. *Óleos essenciais no controle de Botrytis cinerea: influência na qualidade pós-colheita de uvas 'Rubi'*. Braz. J. Food Technol. vol.22, 2019 Epub Oct 17, 2019

SANTOS, L. D. et al. *Estudo da anatomia foliar e caulinar e análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e cascas dos frutos de citrus medica l*. Eletronic Journal of Pharmacy, vol.13 , n. 3, p. 229-247, 2016

SARTO, M.P.M; ZANUSSO Jr, G. *Atividade antimicrobiana de óleos essenciais*. Rev, Uningá, vol. 20 pp 98 -102, 2014

SILVA, J. C. *Uso de óleos essenciais, extratos vegetais e indutores de resistência no*

controle alternativo do mal-do-panamá na bananeira. Dissertação (Mestrado em Ergonomia) Rio Largo, AL: UFAL, 2007. 66 p.

SILVA, T. G. et al. *Composição química do óleo essencial da casca de Citrus sinensis L. e Citrus aurantiun L.* In: VII SBOE, 2013. Anais do Simpósio Brasileiro de óleos essenciais Santarém, PA: UFOPA, 2013. CD-ROM (Ciência, Tecnologia & Inovação na Amazônia).

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; FIGUEIREDO, J. O. *Composição química de óleos essenciais de quinze genótipos de limão em duas épocas de colheita*. Citrus Research & Technology , v.34, n.2, p.65-74, 2013

VIGO, S. C. *Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crescimento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência*. Summa phytopathol. vol.35. 2009

VAN LONN, L. C. *Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins*. European Journal of Plant Pathology 103: 753–765, 1997.

7. ANEXO A

Normas da Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável

Os Artigos devem conter de 10 a 25 páginas. Não estamos recebendo trabalho de revisão. Os trabalhos podem ser enviados nos seguintes idiomas: português, inglês ou espanhol.

Normas técnicas para a publicação de artigos científicos:

1. Características técnicas:

- O editor de texto aceito é o Word 6.0 ou superior;
- Fonte: Times New Roman, tamanho 12, com exceção do interior de figuras e tabelas que deverão utilizar tamanho 10;
- Espaçamento do corpo do texto: duplo;
- Espaçamento do resumo, palavras-chave, abstract, keywords e interior de figuras e tabelas: 1,0 linha;
- Alinhamento do texto: justificado;
- Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.
- Alinhamento das referências bibliográficas: à esquerda;
- Margens: 2,5 cm (superior, inferior e direita) e 3,5 cm (esquerda).

2. Características específicas:

Título (até 25 palavras), Autores (até oito), Resumo (até 300 palavras), Palavras-chave (máximo seis), Title, Abstract, Keywords, Introdução (até 600 palavras), Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão(ões), Agradecimentos (opcional) e Literatura Citada, centralizado (exceto Resumo, Palavras-chave, Abstract e Keywords), negrito (exceto Autores) e com iniciais em maiúsculas. Em caso de aceite após correção os nomes dos autores devem ser centralizados, abaixo do título, por extenso e com letras maiúsculas/minúsculas, seguidos de numeração arábica sobrescrita e notas de rodapé, com o endereço e instituição dos autores; fonte financiadora e dados de e-mail do autor para correspondência.

As referências bibliográficas deverão ser apresentadas em ordem alfabética no final do artigo, de acordo com a norma NBR-6023 (ABNT);

Os autores devem ser citados no texto em ordem cronológica conforme exemplos a seguir: Silva (2008); Silva & Silva (2009); Silva et al. (2010). Em final de frase, usar: (Silva, 2008; Silva & Silva, 2009; Silva et al., 2010).

A “Literatura Citada” deve ser listada por ordem alfabética, e utilizar o itálico ao invés de negrito conforme os exemplos a seguir:

a) Artigos de periódicos:

LANA, R.P.; GOES, R.H.T.B.; MOREIRA, L.M. et al. Application of Lineweaver-Burk data transformation to explain animal and plant performance as a function of nutrient supply. *Livestock Production Science*, v.98, p.219-224, 2005.

b) Livros:

MEADOWS, D.H.; MEADOWS, D.L.; RANDERS, J. et al. The limits of growth. A report for the Club of Rome's project on the predicament of mankind. New York: Universe Books, 1972. 205p.

c) Capítulos de livros:

BUMB, B.L. World nitrogen supply and demand: an overview. In: BACON, P.E. (Ed.) Nitrogen fertilization in the environment. New York: Marcel Dekker inc., 1995. p.1- 40.

d) Trabalhos em anais de congresso:

GUIMARÃES, G.; LANA, R.P.; FIALHO, C.A. et al. Análise econômica de uso de concentrados para vacas em lactação. In: ZOOTEC, 2009. Anais... Águas de Lindóia: ABZ, 2009. CD-ROM. (Gestão do agronegócio e economia).

LANA, R.P.; GUIMARÃES, G.; GUIMARÃES, A.V. et al. Factors affecting milk production in Brazil. Journal of Dairy Science, v.92, E-Suppl. 1, p.427, 2009.

e) Teses e dissertações:

GOES, R.H.T.B. Desempenho de novilhos recriados a pasto, recebendo diferentes níveis e frequência de suplementação, durante o outono, na região amazônica. Tese (Doutorado em Zootecnia). Viçosa, MG: UFV, 2004. 77p.

PAIVA, V.R. Níveis de proteína bruta em dietas para vacas leiteiras da raça Holandesa em confinamento. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Viçosa, MG: UFV, 2009. 42p.

f) Internet:

AARON, S. Some statistics on limited natural resources. 2005.

In: [Http://scotaaron.com/resources2.html](http://scotaaron.com/resources2.html) (acessado em 31 de Julho de 2006).