



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ÉRIKA OLIVEIRA DA SILVA

**TERMOTERAPIA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Pseudomonas*
syringae pv. *tomato* EM SEMENTES DE TOMATE**

**Botucatu
2018**

ÉRIKA OLIVEIRA DA SILVA

**TERMOTERAPIA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Pseudomonas*
syringae pv. *tomato* EM SEMENTES DE TOMATE**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Zanin Kronka

Botucatu

2018

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

S586t Silva, Érika Oliveira da, 1990-
Termoterapia e óleos essenciais no controle de
Pseudomonas syringae pv. *tomato* em sementes de tomate /
Érika Oliveira da Silva. - Botucatu: [s.n.], 2018
57 p.: fots. color., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientadora: Adriana Zanin Kronka
Inclui bibliografia

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle. 2. *Pseudomonas syringae*. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Termoterapia. 5. Germinação. I. Kronka, Adriana Zanin. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TERMOTERAPIA E ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Pseudomonas syringae* pv. tomato EM SEMENTES DE TOMATE

AUTORA: ERIKA OLIVEIRA DA SILVA
ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA

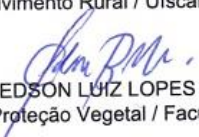
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA
Depto de Proteção Vegetal / FCA/UNESP - Botucatu/SP


Professora Doutora DANILA COMELIS BERTOLIN
AGRONEGÓCIO / FATEC SÃO JOSÉ DO RIO PRETO


Dra. MARILEIA REGINA FERREIRA
SAAE/SP Mogi / Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo


Profa. Dra. ANA PAULA DE OLIVEIRA AMARAL MELLO
Desenvolvimento Rural / Ufscar - Centro de Ciências Agrárias


Prof. Dr. EDSON LUÍZ LOPES BALDIN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Botucatu, 25 de junho de 2018

Dedico

À Isabela Oliveira Guarido, que mesmo tão pequena soube me dar um amor tão grande e me ensinar a amar tão grandemente o pequeno. Saiba que é por você. É tudo por você.

Ofereço

A todas as mulheres que tornaram este trabalho possível de ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e antes de tudo, eu agradeço a Deus por me proporcionar fé e coragem para seguir em frente, mesmo quando eu achei que não havia mais luz;

Aos meus pais por me concederem a vida;

À professora Adriana Zanin Kronka, pelos ensinamentos, orientação e confiança, fundamentais para o meu aperfeiçoamento profissional e conclusão deste trabalho;

A minha filha Isabela por ter me dado forças pra continuar e ter me dado a melhor experiência do mundo que foi de ser mãe;

A todas as pessoas que me ajudaram a combater a depressão pós-parto e acreditaram que eu conseguiria confeccionar esta tese.

A minha madrinha Carmen Lopes, por acreditar em mim, não desistir e me ajudar sempre de prontidão a cada ajuda que precisei;

A pastoral da sobriedade de Lençóis Paulista e ao grupo Bolsistas Capes;

Ao meu avô Ordello (*in memoriam*) que estaria muito orgulhoso em ver até onde consegui chegar;

A todos os professores que passaram por mim nesses anos de doutorado que me permitiu obter um grande conhecimento, base para a conclusão dessa tese;

Aos amigos que me acolheram e me ajudaram nessa trajetória, em especial ao David, pelos conselhos adquiridos e pelos abraços de conforto;

Aos colegas de laboratório que disponibilizaram tempo e conhecimento para me ajudar na execução dos meus experimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

“Ninguém vai bater mais forte que a vida. Não importa como você bate, e sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha!”

Rocky Balboa

RESUMO

A pinta bacteriana do tomateiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Okabe (Pst), é uma das principais doenças da cultura, pois pode reduzir a qualidade e o rendimento da produção, afetando o mercado de tomates frescos e transformados. A semente de tomate infectada por Pst, além de manter a bactéria viável por um longo período, também é importante por ser uma fonte primária de inóculo, justificando a necessidade de utilização de sementes isentas do patógeno. Desse modo, esse trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência da termoterapia e da aplicação de óleos essenciais como alternativas para o tratamento de sementes de tomate, visando ao manejo de Pst. Inicialmente, foi verificada a ação *in vitro* dos óleos essenciais (OE) de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel), nas concentrações de 1%, 2% e 3%, utilizando-se leite em pó (LP - 1%) como emulsificante. Sulfato de estreptomicina (25mg/mL) e água esterilizada + LP foram incluídos como testemunhas. Os OE de tomilho (2 e 3%) e de citronela (nas três concentrações) e o sulfato de estreptomicina inibiram o desenvolvimento da colônia bacteriana, promovendo a formação do halo de inibição. Em seguida, foram conduzidos experimentos independentes, um para testar o tratamento de sementes com os OE selecionados (citronela a 1% e tomilho a 2%) e outro, com a termoterapia (50°C/30' e 50°C/25'). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Foram avaliados a incidência de Pst nas sementes, a germinação e o vigor (altura de plantas). Todos os tratamentos testados promoveram a erradicação de Pst nas sementes. A presença de Pst nas sementes não interferiu na germinação destas, mas promoveu uma redução na altura das plantas. O tratamento com OE de tomilho resultou em redução significativa da germinação e do vigor. Os tratamentos térmico (ambas as combinações temperatura/tempo de exposição) e com óleo essencial de citronela a 1% mostraram-se alternativas viáveis para o manejo de Pst em sementes de tomate.

Palavras-chave: pinta bacteriana do tomateiro, patologia de sementes, controle alternativo, germinação, vigor.

ABSTRACT

The bacterial speck of tomato, caused by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), is among the main diseases of this crop, as it can reduce the quality and production yield, affecting the market of fresh and processed tomatoes. Pst-infected tomato seed, besides maintaining the bacterium viable for a long period, is also important because it is a primary source of inoculum, demonstrating the need of using Pst-free seeds. Thus, the objective of this work was to evaluate the efficiency of thermotherapy and the application of essential oils as alternatives for tomato seeds treatment, aiming at the management of Pst. Initially, the essential oils (EO) of citronella, lemon grass, thyme and tea tree were evaluated in concentrations of 1%, 2% and 3% (powder milk (PM - 1%) was used as emulsifier). Streptomycin sulfate (25mg/mL) and sterile water + PM were included as controls. Thyme (2% and 3%) and citronella (at three concentrations) EO and streptomycin sulfate inhibited the bacterial colonies development, promoting inhibition halo the formation. Then, independent experiments were carried out, one to test the seed treatment with the selected EOs (citronella 1% and thyme 2%) and another with thermotherapy (50°C/30' and 50°C/25'). All experiments were performed in duplicate. The incidence of Pst in seeds, germination and vigor (plant height) were evaluated. All the tested treatments promoted the eradication of Pst in the seeds. Pst presence in the seeds did not interfere in seeds germination, but promoted a reduction in plant height. Treatment with thyme EO resulted in a significant germination and vigor reduction. Thermal treatments (both temperature/exposure time combinations) and 1% citronella EO were found to be viable alternatives for Pst management in tomato seeds.

Keywords: bacterial speck of tomato, seed pathology, alternative control, germination, vigor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	A cultura do tomateiro.....	21
2.2	A pinta bacteriana do tomateiro.....	22
2.3	Óleos essenciais no manejo de patógenos de plantas.....	24
2.4	Termoterapia no tratamento de sementes.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Obtenção do isolado de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	30
3.2	Obtenção de sementes inoculadas com <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	30
3.3	Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais sobre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	31
3.4	Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais e da termoterapia no manejo de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	32
3.5	Efeito do tratamento com óleos essenciais e da termoterapia sobre a qualidade fisiológica das sementes.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais sobre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	35
4.2	Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais e da termoterapia no manejo de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	39
4.3	Efeito do tratamento com óleos essenciais e da termoterapia sobre a qualidade fisiológica das sementes.....	41
5	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas syringae pv. *tomato* é o agente etiológico da pinta bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), considerada uma das mais importantes doenças da cultura na maioria das regiões produtoras. A semente infestada de tomate, além de manter a bactéria viável por um longo período, também é importante por ser uma fonte primária de infecção, uma vez que os danos causados podem diminuir consideravelmente a produção.

As doenças que incidem na cultura do tomateiro ocasionam perdas significativas na produção e os produtores, na maioria das vezes, restringem-se ao uso de produtos químicos sintéticos para evitar tais prejuízos. O emprego destes produtos, quando realizado de maneira indiscriminada, pode resultar em poluição ambiental e seleção de uma população patogênica resistente aos princípios ativos adotados. A opção dos produtores por estas medidas de controle objetiva minimizar riscos de prejuízos financeiros, pois a cultura envolve alto custo de implantação e de condução da lavoura.

Neste contexto, tem-se procurado alternativas de manejo que causem menor impacto ambiental e ao homem. Os óleos essenciais constituem-se como uma opção na busca pelo controle alternativo, pois contêm componentes capazes de desempenhar importantes funções na interação planta-patógeno, atuando como substâncias antimicrobianas ou ativando os mecanismos de defesa da planta, de maneira semelhante aos fungicidas sintéticos. A vantagem dos óleos essenciais de plantas medicinais é que eles não provocam poluição do ambiente e podem ser considerados uma alternativa para o manejo de fitopatógenos. A termoterapia é outra técnica alternativa de controle de fitopatógenos, sendo bastante apropriada para o manejo de bactérias em sementes. A adoção desta técnica requer certos cuidados para se obter o resultado esperado (erradicar ou reduzir a baixos níveis os patógenos veiculados às sementes), pois, se mal aplicada, pode causar danos à qualidade fisiológica das sementes, interferindo na germinação e no vigor. A eficiência da termoterapia depende, principalmente, da natureza do patógeno alvo e sua localização nas sementes, do vigor destas e sua sensibilidade a temperaturas elevadas.

Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a eficiência da termoterapia e da aplicação de óleos essenciais no tratamento de sementes de tomate, visando ao manejo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), anteriormente classificado como (*Lycopersicon esculentum* Mill.), tem como centro de origem a região andina, tendo sua ampla domesticação ocorrido no México, considerado seu centro de origem secundário (COLARICCIO, 2002). Foi introduzido na Europa, via Espanha, de onde se difundiu para outros países, sendo, posteriormente, reintroduzido nos Estados Unidos. No Brasil, o hábito de consumo desta espécie ocorreu por meio de imigrantes europeus no final do século XIX (ALVARENGA, 2004).

O tomate é considerado um produto de grande importância socioeconômica em nível mundial, sendo responsável por alimentar milhões de pessoas direta ou indiretamente. É considerada uma cultura estratégica, pois sua produção é diversa no mundo, sendo uma cultura com altos rendimentos e apresentando um ciclo relativamente curto, produzida de modo familiar até grandes agroindústrias, movimentando uma rica cadeia produtiva, com faturamento de 14 bilhões em 2017, segundo o Anuário Brasileiro de Hortaliças (2017).

De acordo com a FAO, a China é o principal produtor de tomate no mundo, sendo responsável por 31% da produção mundial. Em seguida, aparecem Índia (11% da produção mundial) e Estados Unidos (8%), estando o Brasil na nona colocação, com 2,5% do volume global (4,3 milhões de toneladas de frutos). O Estado de Goiás ocupa o primeiro lugar do ranking brasileiro, com 17% da área colhida, seguido de Minas Gerais (16%) e São Paulo em terceiro (15%) (DOSSA; FUCHS, 2017).

O tomate destaca-se como a segunda hortaliça mais cultivada mundialmente, podendo ser cultivado no mundo inteiro, em regiões tropicais e subtropicais, com a produção destinada à indústria de processamento (tomate rasteiro) ou para consumo *in natura* (tomate tutorado) (SANTOS, 2009).

O fruto ocupa lugar de destaque na mesa do consumidor, sendo considerado um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, e minerais importantes, como fósforo e potássio, além de cálcio, ácidos fólicos e frutose. Também é rico em licopeno, substância conhecida no combate a radicais livres

produzidos no organismo humano. O consumo dessa substância, presente tanto no fruto fresco como no processado, ajuda na prevenção de cânceres, como aqueles relacionados ao aparelho digestivo e de próstata (SHAMI; MOREIRA, 2004).

A cultura do tomate está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem limitar sua produção (LOPES; REIS; ÁVILA, 2003; KUROZAWA; PAVAN, 2005). Segundo Lopes e Ávila (2005), apesar de cerca de duzentas doenças já terem sido relatadas na cultura, raramente mais de cinco dessas aparecem ao mesmo tempo, porém sua ocorrência pode resultar em grandes danos e prejuízos, chegando a limitar a tomaticultura em algumas épocas de cultivo e regiões do País.

No contexto de doenças, os fungos são considerados os grandes vilões da tomaticultura, responsáveis pelo maior número de doenças na cultura e, também, por grande parcela do custo de produção, devido ao uso de fungicidas para o controle destes agentes (LOPES; ÁVILA, 2005). Comparativamente, não são muitas as doenças bacterianas, porém, estas representam um grande desafio para a tomaticultura, pela dificuldade de controle, devido à rápida multiplicação desses patógenos, à sua eficiente disseminação e aos poucos produtos químicos capazes de oferecer proteção eficiente e duradoura. Dessa forma, o controle das bacterioses na cultura baseia-se no emprego de medidas preventivas, que desfavoreçam a introdução, multiplicação e disseminação desses patógenos (LOPES; REIS; ÁVILA, 2003; KUROZAWA; PAVAN, 2005; LOPES; ÁVILA, 2005). A pinta bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, está entre as principais bacterioses que afetam o tomateiro.

2.2 A pinta bacteriana do tomateiro

No Brasil, a pinta bacteriana foi relatada em 1959, porém causou graves prejuízos somente a partir de meados da década de 70, decorrente das mudanças de tratos culturais e pela substituição de variedades que eram até então empregadas. Essa bactéria pode reduzir a qualidade e o rendimento da produção, afetando mercado de tomates frescos e transformados (VARVARO; PIETRARELLI, 2006).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* Okabe (Pst) é uma bactéria baciliforme, aeróbica, gram-negativa, que se move através de flagelos polares. Quando cultivada

em meio de extrato de carne, as colônias são esbranquiçadas, e em meio King B, elas produzem pigmentos fluorescentes (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Assim como outros patógenos bacterianos, *Pst* sobrevive preferencialmente em locais da folha, tais como depressões entre câmaras sub-estomáticas, células epidérmicas e em torno de tricomas (VARVARO; PIETRARELLI, 2006). A bactéria é transmitida pela semente, sendo disseminada dessa forma a longas distâncias. A curta distância, sua disseminação ocorre pela ação de respingos de chuva ou de água de irrigação, principalmente se associada à ocorrência de ventos fortes (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005). Embora esta doença não leve a perdas totais da planta, os sintomas no fruto podem reduzir a comercialização (HERMAN; DAVIDSON; SMART, 2008).

A doença ataca toda a parte aérea das plantas. Primeiramente, é observada nas folhas, nas quais ocasiona lesões escuras de 2-3 mm de diâmetro. Nas hastes, os sintomas se assemelham, porém não se nota a presença do halo clorótico. Os sintomas são mais característicos nos frutos, ocasionando lesões superficiais, puntiformes e escuras que podem ser arrancadas com a unha, raramente excedendo 1,0mm de diâmetro. Nas mudas, ocorrem desfolha e queda dos cotilédones, além de retardo no crescimento vegetativo (MALAVOLTA JÚNIOR; RODRIGUES NETO, 1991).

Os danos causados por esta bactéria podem diminuir a produção em até 30% (SILVA; LOPES, 2005). Porém, estes danos só serão significativos com a ocorrência de elevada desfolha e ataque aos órgãos florais, que resultam no abortamento das flores. Ressalta-se que, mesmo não afetando a polpa dos frutos, a qualidade visual destes é prejudicada (HERMAN; DAVIDSON; SMART, 2008).

A bactéria pode permanecer viável na semente por até vinte anos, o que faz com que a busca por material propagativo sadio ou isento de patógenos seja essencial para que não haja uma perda significativa na produtividade. Em relação à sobrevivência dessa bactéria no solo, dependendo da existência de restos culturais, pode atingir vários meses, caso contrário, sua permanência é de curta duração. Quando prevalecerem condições desfavoráveis para a infecção, ela poderá existir no solo como residente (MALAVOLTA JUNIOR; RODRIGUES NETO, 1991).

Para o controle desta doença, recomenda-se o uso de variedades com resistência conferida pelo gene *Pto*, presente, por exemplo, na cultivar BRS Tospodoro (STOCKINGER; WALLING, 1994; SILVA et al., 2002); não realizar o

plantio de mudas que apresentem sintomas da doença, principalmente nos períodos em que sua ocorrência seja mais propícia (SILVA; LOPES, 2005); utilização de sementes e mudas sadias, controle da irrigação, visto que bactérias fitopatogênicas são extremamente dependentes de alta umidade para sua multiplicação e/ou disseminação; preferir irrigação em sulco, pois desfavorece a disseminação de patógenos foliares, em comparação com irrigação por aspersão; escolha do local e época de plantio; adubação equilibrada; eliminação de plantas doentes; rotação de culturas; controle alternativo com o emprego de produtos de origem vegetal (extratos e óleos essenciais); tratamento térmico; controle químico sintético e controle biológico (MALAVOLTA JÚNIOR; RODRIGUES NETO, 1991). Deve-se ressaltar que o controle químico, pode colocar em risco a saúde do agricultor, pois o tomate é colhido diariamente e os períodos de carência dos produtos nem sempre são obedecidos (ABREU, 2006; GAUR; SHARMAM, 2010).

2.3 Óleos essenciais no manejo de patógenos de plantas

A maioria dos produtos para tratamento de sementes é sintética, sendo aplicada em formulações e dosagens diversas (VANZOLINI; TORRES; PANIZZI, 2000), não podendo, por este motivo, ser utilizada no setor orgânico. Como alternativa, produtos naturais extraídos de plantas, como extratos e óleos essenciais, estão sendo investigados por apresentarem propriedades antimicrobianas capazes de controlar patógenos associados às sementes (MORAIS et al., 2001).

As plantas aromáticas e medicinais, de modo geral, têm, em sua composição, substâncias que podem exercer importantes funções na interação planta-patógeno, por ação bactericida (VIGO-SCHULTZ, 2006), fungitóxica (OLIVEIRA; PASCHOLATI; LEITE, 2010) ou indução de respostas de defesa da planta, através da produção de fitoalexinas, aumento da atividade das proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) e da síntese de outros compostos bioquímicos e estruturais de defesa da planta (PEREIRA, 2008).

Estudos conduzidos com óleo essencial ou extrato bruto, extraídos de plantas medicinais, têm mostrado o potencial de controle de fitopatógenos destes produtos, por ação fungitóxica direta e/ou pela indução de produção de fitoalexinas e outros compostos de defesa (FRANZENER et al., 2007).

Os óleos essenciais são produzidos por meio de vias metabólicas secundárias das plantas e compreendem misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas das plantas. Na natureza, estes produtos são importantes para a proteção das plantas, pois têm ação antibacteriana, antifúngica, inseticidas e também contra a predação de herbívoros. Além disso, podem atrair insetos, favorecendo a dispersão de pólenes e sementes, e repelir aqueles indesejáveis. Em geral, os óleos essenciais são extraídos de certas partes das plantas pelo método de destilação por arraste de vapor d'água, entre outros. Seus componentes são complexos e variáveis, destacando-se os de baixo peso molecular (monoterpenos com dez carbonos e sesquiterpenos, com quinze carbonos) (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Alguns estudos apontam que os óleos essenciais afetam a integridade da membrana plasmática das células bacterianas. Os componentes do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) rompem a membrana da célula de *Candida albicans*, comprometendo a sua permeabilidade e levando à lise (BARD et al., 1988; COX et al., 2000). Isso ocorre em função da inativação de respostas fisiológicas via transdução do fluxo intracelular, pelas interações dos terpenoides com a membrana plasmática (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995). A interação dos terpenos possibilita a alteração da permeabilidade iônica e fluxos através da membrana plasmática, permitindo a reação oxidativa nos sistemas de células vegetais após tratamentos elicitores (NÜRNBERGER et al., 1994). Segundo Piper et al. (2001), a ação dos óleos essenciais e seus componentes, quando em contato com os microrganismos, provoca um aumento da permeabilidade celular, resultando na vazão dos seus constituintes.

Alguns trabalhos mostraram a eficiência do uso de óleos essenciais para o controle de patógenos em sementes. Morais et al. (2008), ao avaliar o efeito dos óleos essenciais de melaleuca (*Melaleuca* sp.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* e *C. flexuosus*) e manjerição (*Ocimum* sp.) na sanidade de dois lotes de sementes de feijão, observaram uma menor incidência de alguns fungos (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp e *Cladosporium* sp.), porém os autores constataram redução na germinação das sementes quando tratadas com *C. citratus* (lote 1) e *C. flexuosus* e melaleuca (lote 2).

Costa et al. (2008) estudaram a ação do óleo essencial de citronela, com concentrações variando de 0,25% a 8,0%, sobre *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovora*), e verificaram a formação de halos de inibição maiores do que o proporcionado pelo antibiótico tetraciclina (30µL/mL); no estudo, a concentração inibitória mínima do óleo essencial de citronela foi de 1,0%.

Romero et al. (2011), ao avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Illicium verum* no controle de fungos fitopatogênicos em sementes de alface e de tomate, observaram que os óleos promoveram uma completa inibição de crescimento dos fungos *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum truncatum*, e não afetaram a germinação das sementes.

Silva, Martins e Alves (2014), ao analisarem o efeito de diversos óleos essenciais sobre a bactéria Pst, verificaram que, no ensaio *in vitro*, os óleos essenciais de citronela, eucalipto, capim-limão e canela, a partir da concentração de 1%, formavam halos de inibição, e no teste *in vivo*, o óleo essencial de citronela apresentou um controle da doença de 81% quando aplicado antes da inoculação com a bactéria.

As substâncias naturais obtidas de óleos essenciais e extratos vegetais apresentam as vantagens de não promover a contaminação ambiental, oferecer menor risco à saúde humana, ser de fácil aplicação e apresentar eficiência comprovada no controle de doenças em diversas culturas, constituindo-se, portanto, em uma considerável alternativa ao uso de agrotóxicos. Várias pesquisas demonstram a eficiência de óleos essenciais na inibição do desenvolvimento *in vitro* de fitopatógenos e no controle de doenças em plantas, porém pesquisas aplicadas em campo ou em sistemas de produção ainda são escassas.

2.4 Termoterapia no tratamento de sementes

A utilização de sementes isentas de patógenos ou dentro de padrões de tolerância estabelecidos para as culturas é fundamental para diminuir a disseminação destes agentes via sementes. Do ponto de vista sanitário, isso significaria que a semente ideal deveria ser livre de qualquer microrganismo indesejável. No entanto, a obtenção de tais sementes dificilmente é alcançada, pois

a qualidade sanitária das sementes é fortemente influenciada pelas condições climáticas em que estas foram produzidas e armazenadas (GOULART, 1998).

De maneira geral, o tratamento de sementes compreende qualquer operação com as sementes, incluindo o manejo por meio da incorporação, na superfície destas ou internamente, de produtos químicos ou biológicos, e/ou o emprego de agentes físicos, objetivando a melhoria ou garantia do seu desempenho em condições de cultivo. No que se refere ao controle de patógenos, o tratamento de sementes pode ser realizado empregando-se métodos químicos, físicos, biológicos, de forma isolada ou combinada (ZAMBOLIM, 2004). O tratamento de sementes é considerado uma técnica de custo baixo, cujo efeito no ambiente é bem restrito em comparação a outras formas de aplicação de produtos químicos (MORAES, 2004).

A termoterapia é uma das técnicas mais citadas e descritas na literatura para erradicação de fitobactérias localizadas interna ou externamente nas sementes (ZAMBOLIM, 2004).

O sucesso do tratamento térmico depende do tipo de calor, seco ou úmido, da temperatura empregada, do período de exposição e da uniformidade da aplicação do calor (MENDES et al., 2001), devendo ser cuidadosamente ajustados à espécie, cultivar e lote. Contudo, seja qual for a modalidade empregada, a termoterapia requer o uso de equipamentos com controle preciso de temperatura, apresentando, conseqüentemente, inconvenientes quando aplicada a grandes quantidades de sementes (ESTEFANI; MIRANDA FILHO; UESUGI, 2007).

Os métodos de tratamento variam conforme a espécie, a cultivar e as condições iniciais do lote das sementes. Para o tratamento de sementes de tomate com água quente, os poucos trabalhos publicados apresentam uma grande variação na recomendação de combinações de temperatura e tempo de exposição e os resultados são diversificados, com pouca informação sobre os seus efeitos no vigor das sementes.

A termoterapia com imersão das sementes em água quente é considerada mais eficiente quando comparada ao tratamento com uso do calor seco (GRONDEAU; LADONNE; FOURMOND, 1992), pois a água em seu estado líquido proporciona maior condutividade de calor em relação aos demais veículos (MACHADO, 2000) e é recomendada para várias espécies de hortaliças como aipo, alface, cenoura, crucíferas, espinafre, pepino, pimenta e tomate (NEEGAARD, 1979). Entretanto, tal

tratamento pode provocar desnaturação dos tecidos externos das sementes, e, após um determinado período, os tecidos de reserva que possibilitam a germinação das sementes (MACHADO, 2000). Menten (1995a) ressalta que a água quente causa danos às sementes em função do rompimento do tegumento e/ou extravasamento de substâncias da semente.

Nos trabalhos que contemplam os tratamentos com água quente, são várias as recomendações de combinações temperatura/tempo de exposição, além de pré-tratamentos que visam melhorar a eficiência do método, na erradicação do patógeno, sem afetar o desempenho das sementes. Destaca-se, contudo, a observação em alguns trabalhos (VERZIGNASSI; VIDA; HOMECHIN, 1997; MENDES et al., 2001) de um efeito mais expressivo do tempo do que da temperatura de exposição das sementes em alguns tratamentos, tanto no controle dos patógenos quanto na viabilidade das sementes.

Segundo Machado (2000), quanto menor for a qualidade fisiológica da semente, mais danosa ao vigor será a termoterapia. Sementes com vigor comprometido são menos tolerantes a temperaturas mais altas do que sementes mais vigorosas. Fatmi, Schaad e Bolkan (1991) observaram que o tratamento de sementes por termoterapia pode reduzir a população de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, porém esse método pode afetar na germinação dessas sementes. Silva et al. (2002), avaliando o tratamento térmico na erradicação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate, constataram uma eficiência de 100% na erradicação da bactéria e não houve efeito do tratamento sobre a germinação. Tedesco et al. (2004) submetem sementes de feijoeiro à termoterapia visando a erradicação da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* e constataram que o tratamento não afetou o percentual de germinação. Segundo Stefani, Miranda e Uesugi (2007), a termoterapia promoveu a redução do número de células da bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro inoculadas e eliminou a bactéria em sementes naturalmente infectadas, porém ocasionou uma redução significativa da germinação e do vigor das sementes submetidas ao tratamento.

Em sementes de tomate, há controvérsias quanto à indicação dos parâmetros de tratamento com água quente. Dhingra, Muchovej e Cruz Filho (1980) recomendaram a temperatura de 50°C por 25 minutos para o tratamento de sementes de tomate,

independentemente do patógeno alvo. Esta mesma combinação temperatura-tempo de exposição foi sugerida por Machado (2000) para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Alternaria solani*. Carmo et al. (2004) verificaram que o mesmo tratamento não afetou o vigor das sementes, avaliado pelo teste de primeira contagem de germinação e emergência de plântulas, porém não foi alcançada eficiência na erradicação de *X. vesicatoria*. Muniz (2001), também observou que o tratamento de sementes de tomate a 50°C por 30 minutos não controlou *Cladosporium fulvum*, *Fusarium* spp. e *Alternaria alternata*, e afetou a viabilidade das sementes. Porém, com 56°C por 30 minutos, McMillan Jr (1987) havia obtido 100% de controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* sem prejuízo à germinação das sementes de tomate.

Para a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate, Kurozawa e Pavan (1997) recomendaram o tratamento a 56°C por 30 minutos, enquanto Machado (2000) recomendou o uso de água quente a 53°C por 60 minutos. Ikuta (1990) havia constatado que a combinação da temperatura/tempo de exposição letal para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* era 62°C por 30 minutos, mas afetava significativamente a porcentagem e velocidade de emergência dos lotes tratados

Estudos prévios mostraram que os óleos essenciais de tomilho, citronela, capim-limão e melaleuca possuem atividades antimicrobianas quando aplicadas em plantas de tomateiro infectadas por *P. syringae* pv. *tomato* para no controle da pinta bacteriana, em casa de vegetação (SILVA; MARTINS; ALVES, 2014), mas não há trabalhos comprovando a eficiência desses óleos quando aplicados em sementes de tomateiro infectadas pela mesma bactéria. A termoterapia é uma prática muito usual para o controle de *Xanthomonas vesicatoria*, causadora da mancha bacteriana em sementes de tomateiro, porém não há estudos sobre sua aplicação para o controle de Pst nas sementes dessa cultura.

As respostas desses tratamentos (termoterapia e óleos essenciais) podem ser de grande valia no que se diz respeito à produção orgânica de tomate, prática na qual produtos químicos sintéticos não podem ser empregados. Assim, a aplicação de produtos químicos naturais e do tratamento físico podem se constituir alternativa viável ao controle químico convencional no controle de fitopatógenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes e em casa vegetação do Departamento de Proteção Vegetal (DPV), da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, no período de fevereiro de 2016 a abril de 2017.

3.1 Obtenção do isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

O isolado de Pst utilizado neste estudo pertence à coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da FCA/UNESP. Esse isolado encontrava-se preservado em glicerol e em ultrafreezer. Para confirmar sua viabilidade, o isolado foi repicado para o meio 523 de Kado e Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas e incubado a 28°C, por 48 horas. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540nm} = 0,20$, correspondendo a aproximadamente 10^8 ufc/mL. Posteriormente, esse isolado foi inoculado em quatro plantas de tomate sadias previamente expostas à câmara úmida por um período de 24 horas, via pulverização foliar até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas foram submetidas novamente à câmara úmida para garantir o sucesso da inoculação. Todas as plantas inoculadas manifestaram sintomas da doença (pinta bacteriana) e as mostras foliares de cada planta com sintomas foram recolhidas e levadas ao laboratório para o isolamento da bactéria em fevereiro de 2016, e então esse novo isolado foi usado para os trabalhos posteriores.

3.2 Obtenção de sementes inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

A cultivar utilizada no experimento foi Santa Cruz Kada. As sementes foram avaliadas quanto à sanidade pelo método do papel de filtro “blotter test”, colocando-se três discos de papel de filtro previamente umedecidos com água destilada em placas de Petri de plástico, distribuindo-se, posteriormente, sobre este substrato, 25 sementes equidistantes. Foram realizadas 16 repetições de 25 sementes por tratamento, totalizando uma amostra de trabalho com 400 sementes. As placas contendo as sementes foram incubadas em câmara BOD a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias (BRASIL, 2009). Após este período, as sementes foram

examinadas individualmente, sob microscópio estereoscópico, para a detecção do patógeno. Desta forma, foi comprovado que as sementes estavam isentas de Pst.

Para a inoculação por imersão, foi empregada a técnica descrita por Bashan e Assouline (1983), em que as sementes foram imersas na suspensão de células bacterianas na concentração de 10^8 ufc/mL obtidas através de culturas puras de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Após a inoculação, as sementes foram distribuídas sobre papel *germitest* e secas em câmara de fluxo laminar por 24 horas. Em seguida, foram acondicionadas em frascos de vidro e conservadas em geladeira, até a realização dos testes. Para confirmação do sucesso da inoculação da bactéria nas sementes, meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) foi vertido em placas de Petri e posteriormente amostras de sementes inoculadas foram dispostas ao longo da placa e mantidas a 28°C em BOD. Após 48 horas de incubação, foi observada a presença de um halo bacteriano em volta das sementes, evidenciando sucesso na inoculação.

3.3 Efeito *in vitro* de óleos essenciais sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram adquiridos da empresa Bioessência[®], sendo extraídos das folhas das plantas e obtidos pela técnica de arraste a vapor. De acordo com a análise feita no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, os compostos majoritários dos óleos essenciais foram: citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) - citronelal (29,98%), citronelol (14,34%) e o geraniol (18,2%); capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) - citral (76%); tomilho (*Thymus vulgaris* L.) - timol (51,35%), p-cimeno (20%) e o carvacrol (4,4%); melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel) - terpineol (43,5%).

Com o objetivo de examinar o potencial de inibição direta dos óleos essenciais sobre o desenvolvimento da bactéria, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatorze tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram constituídos pelos óleos essenciais de citronela, capim-limão, tomilho e melaleuca, nas concentrações de (v/v) 1%, 2% e 3%; sendo utilizado leite em pó (LP - 1%) como emulsificante para os tratamentos à base dos óleos essenciais. Os tratamentos sulfato de estreptomicina (25mg/mL) e água esterilizada + LP foram incluídos como testemunhas. Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram autoclavados e posteriormente embebidos em 20 µL de cada tratamento,

secos à temperatura ambiente e colocados em placas de Petri sobre meio 523 de Kado e Heskett (1970), contendo 200 µL da suspensão bacteriana na concentração de 5×10^8 ufc mL⁻¹ (A 540nm = 0,2), (SILVA; LOPES, 2005). Para verificar o efeito dos tratamentos, foi avaliada a presença ou ausência de halos de inibição 48 horas depois da incubação em câmara de crescimento, ajustada para 28°C (LUCAS, 2009).

3.4 Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais e da termoterapia no manejo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Com base nos resultados dos ensaios *in vitro*, os óleos essenciais de citronela e tomilho foram selecionados para dar continuidade ao trabalho. Para o tratamento das sementes com os óleos essenciais, os mesmos foram misturados em água destilada esterilizada e emulsificados com leite em pó a 1%. Foi adotada a concentração de 1% para o óleo essencial de citronela e 2% para o óleo essencial de tomilho, que foram as menores concentrações eficientes no controle da bactéria no experimento *in vitro*. As sementes foram imersas nas soluções por cinco minutos e, em seguida, dispostas sobre papel toalha para secar. Foram incluídos dois tratamentos testemunha: um composto por sementes inoculadas e outro por sementes não inoculadas, ambos imersos apenas em água destilada esterilizada + leite em pó (1%), pelo mesmo período anteriormente descrito.

O tratamento térmico empregado foi por imersão, no qual as sementes foram colocadas em sacos porosos e posteriormente tratadas em banho-maria com água aquecida na temperatura e tempos de tratamento pré-determinados. Foram empregados quatro tratamentos: i) sementes isentas de Pst tratadas a 50°C por 30 minutos; ii) sementes isentas de Pst tratadas a 50°C por 25 minutos; iii) sementes inoculadas com Pst e tratadas a 50°C por 30 minutos; e iv) sementes inoculadas com Pst e tratadas a 50°C por 25 minutos. Posteriormente, essas sementes foram secas por 24 horas em papel toalha na temperatura ambiente.

Em experimentos independentes, após o tratamento com os óleos essenciais e o tratamento térmico das sementes, estas foram avaliadas quanto à sanidade, colocando-se 25 sementes equidistantes, utilizando-se quatro repetições dispostas em placas de Petri sobre meio 523 de Kado e Heskett (1970), totalizando uma

amostra de 100 sementes/tratamento/experimento. Posteriormente, estas foram mantidas em BOD a 28°C por 48 horas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições em cada experimento. Foi avaliada a presença ou ausência de Pst nas sementes.

3.5 Efeito do tratamento com óleos essenciais e da termoterapia sobre a qualidade fisiológica das sementes

As sementes tratadas conforme descrito no item 3.4 também foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica, sendo conduzidos testes de germinação e vigor.

A germinação das sementes foi avaliada pelo método do rolo de papel (BRASIL, 2009). O papel de germinação foi autoclavado e pré-umedecido com quantidade de água destilada esterilizada equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. As sementes foram distribuídas sobre duas folhas e sobrepostas com uma terceira folha, embrulhadas em forma de rolo. Os rolos foram mantidos, no germinador, na posição vertical, a 25 °C. As avaliações foram realizadas ao décimo quarto dia, e os dados foram expressos em porcentagem de plântulas germinadas. O experimento, realizado em duplicata (Experimento 1 e Experimento 2), foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento, totalizando uma amostra de 200 sementes por tratamento. Para a análise estatística, os dados foram transformados para $\arcsin \sqrt{(x/100)}$, submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% (BANZATTO; KRONKA, 2006).

O teste de vigor foi conduzido em casa de vegetação, avaliando-se a altura de plântulas, conforme Sako et al. (2001). O experimento, realizado em duplicata, foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos avaliados foram: i) sementes infectadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e tratadas com termoterapia (50° a 30'); ii) sementes infectadas com Pst e tratadas com o óleo essencial de citronela a 1%; iii) sementes infectadas com Pst e tratadas com óleo essencial de tomilho a 2%; iv) sementes de tomateiro infectadas com Pst e não tratadas; v) sementes livre de Pst.

Foram semeadas cerca de dez sementes de tomate por vaso de 3 kg contendo solo esterilizado, e, sete dias após a germinação, foi feito um desbaste manual,

deixando-se apenas duas plântulas por vaso, onde foram mantidas para o pleno desenvolvimento até o final dos testes e avaliações.

Foram feitas três avaliações da altura das plantas de tomateiro, sendo que a primeira avaliação ocorreu aos sete dias após a emergência das plântulas, a segunda, com 14 dias, e a última com 21 dias. Os dados de altura de plantas, expressos em centímetros, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito *in vitro* de óleos essenciais sobre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Os resultados do experimento *in vitro* estão expressos na Tabela 1 e na Figura 1. Os óleos essenciais de capim-limão e melaleuca não inibiram o desenvolvimento da bactéria, nas três concentrações testadas, o mesmo sendo observado para o tratamento com água esterilizada + leite em pó (testemunha). Por outro lado, o óleo essencial de citronela, nas três concentrações, o óleo essencial de tomilho a 2,0% e 3,0% e o sulfato de estreptomicina inibiram o desenvolvimento da colônia bacteriana, promovendo a formação do halo de inibição.

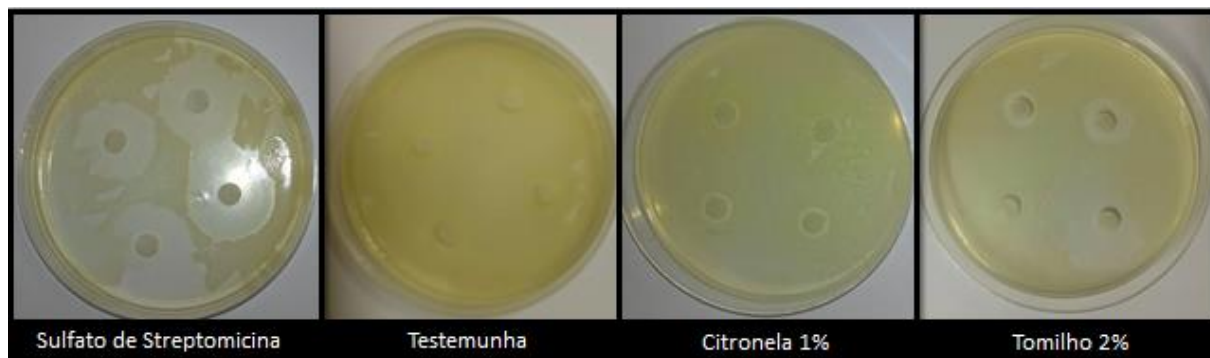
Tabela 1 - Efeito dos óleos essenciais de tomilho, citronela, melaleuca e capim-limão e do sulfato de estreptomicina no desenvolvimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Tratamentos	Concentração		
	1%	2%	3%
Óleo essencial de tomilho	-	+	+
Óleo essencial de citronela	+	+	+
Óleo essencial de melaleuca	-	-	-
Óleo essencial de capim-limão	-	-	-
Leite em pó (1 mg/mL) + água esterilizada ¹		-	
Sulfato de estreptomicina (25 mg/mL) ¹		+	

¹Para o leite em pó + água esterilizada (testemunha) e para o sulfato de estreptomicina foi testada apenas uma concentração.

+ presença de halo de inibição; – ausência de halo de inibição.

Figura 1 - Presença e ausência de halos de inibição da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cultivada em meios acrescidos de leite em pó + água esterilizada (testemunha), sulfato de estreptomicina, óleo essencial de citronela e óleo essencial de tomilho.



Sulfato de estreptomicina (25mg/mL); Testemunha: leite em pó (1mg/mL) + água esterilizada; óleo essencial de citronela a 1% ; e óleo essencial de tomilho a 2%.

O efeito do óleo essencial de tomilho sobre *Pst* observado no presente estudo é semelhante à alguns trabalhos que relatam a inibição do desenvolvimento *in vitro* de diversos microrganismos causadores de doenças fúngicas e bacterianas. Souza et al. (2004) observaram que o óleo essencial de tomilho, na concentração de 2%, inibiu completamente o crescimento micelial *in vitro* de *Rhizopus* sp., *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*. Medice et al. (2007) verificaram efeito direto deste óleo essencial sobre a formação de urédias e urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. Pereira (2008) observou efeito direto desse óleo sobre o fungo *Colletotrichum coffeicola* em plantas de cafeeiro. Romero et al. (2009) constataram efeito fungitóxico do óleo essencial de tomilho a 2% sobre *Myrothecium verrucaria*, *Corynespora cassiicola*, *Sclerotinia minor* e *Colletotrichum musae*. Com relação a bactérias fitopatogênicas, Lucas (2009) verificou a formação de halo de inibição sobre *Xanthomonas vesicatoria* com o óleo essencial de tomilho a 1%; no presente trabalho, essa concentração do óleo essencial de tomilho não foi suficiente para a formação do halo de inibição de *Pst*, sendo este observado apenas nas concentrações 2% e 3%.

O óleo essencial de tomilho tem conhecidas propriedades antimicrobianas, apresentando componentes ativos, como o timol e o carvacrol, que apresentam características semelhantes às de fungicidas e bactericidas (PINTO et al., 2001). O componente hidrofóbico carvacrol interage com as membranas de diversas

bactérias, interferindo na permeabilidade para cátions como H^+ e K^+ . Isso ocorre em função de ação bactericida ou bacteriostática, prejudicando processos celulares vitais, como inibição de enzimas decorrente do vazamento desses íons essenciais, perda de pressão de turgor, redução das atividades metabólicas e alteração na síntese de DNA. A perda da integridade da membrana, também efeito secundário do carvacrol, decorre da desestabilização de interações hidrofóbicas entre lipídios e proteínas, redução da síntese de ATP e morte celular (ULTEE; KETS; SMID, 1999). Segundo Burt e Reinders (2004), o timol também provoca distorção na estrutura física da célula bacteriana, causando expansão e, conseqüentemente, desestabilidade na membrana, alterando a permeabilidade, desnaturando enzimas e modificando a força próton motora, devido a variações de potencial elétrico e pH. Gill e Holley (2006) demonstraram que o carvacrol promoveu uma desorganização das membranas celulares de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei*, quando estas bactérias foram expostas à concentração de 10mM, suficiente para se obter um efeito bactericida imediato. Embora análises celulares não tenham sido conduzidas no presente estudo, provavelmente, a bactéria Pst sofreu estes mesmos efeitos, visto que o timol e o carvacrol estavam entre os principais componentes do óleo essencial de tomilho utilizado, com predominância do primeiro componente (51,35%).

Os óleos essenciais de citronela e capim-limão também são reconhecidos por apresentarem propriedades antimicrobianas e repelentes. A ação destes sobre bactérias fitopatogênicas já foi relatada anteriormente. Martins et al. (2009) estudaram a atividade bactericida de alguns óleos essenciais, entre eles o de citronela, no desenvolvimento *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* e verificaram a ação deste óleo essencial no controle desta bactéria nas concentrações de 8,0%, 4,0% e 2,0%. Amorim et al. (2011), também estudando a ação *in vitro* de óleos essenciais sobre *R. solanacearum*, observaram que o óleo essencial de citronela inibiu o crescimento da bactéria em todas as concentrações testadas (1,25%; 3,5%; 3,7% e 5,0%). Para *Xanthomonas vesicatoria*, Lucas (2009) verificou a formação de halo de inibição com os óleos essenciais de citronela, melaleuca e capim-limão apenas na concentração de 10%. s (2014), avaliando o efeito *in vitro* de diversos óleos essenciais sobre o crescimento de Pst, também verificaram que, a 1%, o óleo essencial de citronela proporcionou a formação de halos de inibição, e que, na

concentração de 10%, os óleos de tomilho, citronela, melaleuca e capim-limão também apresentam efeito inibitório sobre a bactéria.

O óleo essencial de citronela tem como constituintes majoritários os aldeídos b-citronelal, geraniol e B-citronenol (SCHERER et al., 2009), e o de capim-limão, o citronelal e o citral, que, além de apresentar atividade antimicrobiana, podem atuar como eliciadores na indução de fitoalexinas (SANTOS et al. 2009), em plantas de sorgo. Com relação a estes aldeídos, seu mecanismo de ação envolve toxicidade à função e à estrutura da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, preferencialmente, esses aldeídos irão se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas de membrana (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). A permeabilidade da membrana citoplasmática é conferida pelo acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais em sua bicamada lipídica. Em bactérias, a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de íons, como íons potássio e fosfato (BAKKALI; AVERBECK; INDAOMAR, 2008). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática comprometem suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). Portanto, quanto maior a concentração desse óleo essencial utilizada na solução, maior será a capacidade do mesmo em se deslocar em direção à membrana citoplasmática bacteriana, afetando, assim, seu funcionamento. Considerando-se a composição dos óleos essenciais utilizados neste estudo, pode-se atribuir o efeito inibitório positivo do óleo essencial de citronela à ação de seus componentes majoritários. Já para o capim-limão, apesar da alta concentração de citral em sua composição, não se observou o efeito inibitório esperado.

Com relação ao óleo essencial de melaleuca, sua ação predominantemente bactericida, já foi demonstrada, principalmente em bactérias não fitopatogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Segundo Carson, Hammer e Riley (2006), vários autores já demonstraram a ação deste óleo, que inclui a permeabilização do sistema lipossômico, lise e perda da integridade e função da membrana, havendo vazamento e inibição da respiração, alterações morfológicas, entre outras. Ainda segundo esses autores, essa ação se deve aos componentes do óleo essencial, dentre os quais se destaca o terpinol. Este é o componente

majoritário do óleo essencial de melaleuca usado neste trabalho, porém, não houve controle da bactéria, em nenhuma das concentrações testadas.

Sabe-se que os óleos essenciais provenientes de plantas medicinais podem apresentar ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, e ainda, sobre fungos filamentosos e leveduras (PRASHAR et al., 2003), e, de acordo com o presente experimento, fica evidente a ação direta dos óleos essenciais de tomilho e citronela sobre o crescimento de células bacterianas de Pst, tornando-os uma alternativa promissora no controle desse patógeno em sementes de tomateiro.

4.2 Efeito do tratamento de sementes com óleos essenciais e da termoterapia no manejo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Os experimentos de sanidade demonstraram a eficiência do tratamento com óleos essenciais e de termoterapia no controle de Pst em sementes de tomate, uma vez que não foi observada a presença da bactéria nas sementes infectadas submetidas aos respectivos tratamentos (Tabela 2).

As pesquisas sobre emprego de óleos essenciais como alternativa de controle de fitopatógenos vêm aumentando, no entanto, a maioria dos estudos ainda se concentra no efeito *in vitro* destes produtos. O efeito *in vivo* ainda é carente de estudos, principalmente no que diz respeito ao tratamento de sementes com os óleos essenciais. Mais escassas ainda são as pesquisas destinadas à investigação do tratamento de sementes com esses produtos para o manejo de bactérias fitopatogênicas.

A ação fungitóxica do óleo essencial de tomilho já foi relatada sobre *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. em sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), submetidas ao tratamento com esse óleo (KRITZINGER; AVELING; MARASAS, 2002). Tal ação também foi relatada por Pereira et al. (2016) para o óleo essencial de citronela, que promoveu uma redução de 50% na incidência de *Rhizoctonia* sp. e de 100% na de *Pestalotiopsis* sp. em sementes de *Schinus molle* tratadas com esse óleo. Ordoñez Lozada (2016), avaliando o efeito direto dos óleos essenciais de tomilho, capim-limão e citronela como alternativa para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em sementes de cebola, verificaram a ação destes sobre o fungo, protegendo a semente da ação deste patógeno.

Tabela 2 - Presença (+) ou ausência (-) de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em sementes de tomate submetidas ao tratamento com óleos essenciais e termoterapia.

Experimento com óleos essenciais				
Tratamentos	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
Óleo essencial de tomilho (2%)	-	-	-	-
Óleo essencial de citronela (1%)	-	-	-	-
Semente com Pst sem tratamento	+	+	+	+
Semente sem Pst sem tratamento	-	-	-	-
Experimento com termoterapia				
Tratamentos	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
Semente com Pst 50°C/30'	-	-	-	-
Semente com Pst 50°C/25'	-	-	-	-
Semente sem Pst 50°C/30'	-	-	-	-
Semente sem Pst 50°C/25'	-	-	-	-

Rep: repetição por tratamento

Estudo envolvendo controle de bactérias em sementes foi desenvolvido por Mbega et al. (2012), que, avaliando a eficácia de óleos essenciais no controle de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate, verificaram que os tratamentos compostos pelos óleos essenciais de óleos de eucalipto, rosmaninho e niaouli, na concentração de 2%, inibiram totalmente o crescimento da bactéria, não sendo observados efeitos negativos sobre a sua germinação. Os resultados do presente trabalho para o óleo essencial de tomilho concordam com os de Mbega et al. (2012), promovendo erradicação da bactéria nas sementes tratadas.

No que se refere ao tratamento térmico, é importante considerar que por mais eficaz que seja, ele pode causar danos às sementes oriundos de uma má combinação entre temperatura e período de exposição necessário para a eliminação do patógeno alvo. Entretanto, a temperatura letal para o patógeno deve ser consideravelmente inferior à letal para a semente (MACHADO, 2000).

A água em seu estado líquido proporciona maior condutividade de calor em relação aos demais veículos, tornando a termoterapia com água quente eficiente

(GRONDEAU; SAMSON, 1994) e recomendada para sementes de diversas espécies de hortaliças (NEEGAARD, 1979). Sendo assim, o sucesso desse sistema depende do conhecimento da combinação apropriada de temperatura e período de exposição, que varia de acordo com a espécie vegetal, cultivar, lote, vigor inicial, dentre outros fatores. Segundo Grondeau e Samson (1994), nos tratamentos de sementes com água quente, a temperatura deve se manter numa faixa entre 45°C a 60°C por um período de exposição máxima de 60 minutos, independente da espécie.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as recomendações referentes ao tratamento térmico de sementes de tomate. Segundo Dhingra, Muchovej e Cruz Filho (1980), a exposição de sementes de tomate à temperatura de 50°C por 25' seria suficiente para o tratamento térmico destas, independente do patógeno alvo. Machado (2000) também observou a eficiência desse binômio temperatura/tempo de exposição no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Alternaria solani* em sementes de tomate. No presente trabalho, a exposição a 50°C por 25' promoveu a erradicação de Pst das sementes, o mesmo sendo observado para a exposição por 30 minutos.

4.3 Efeito do tratamento com óleos essenciais e da termoterapia sobre a qualidade fisiológica das sementes

O teste de germinação revelou que a presença da bactéria não interferiu na germinação das sementes, visto que, embora tenha sido observada uma ligeira redução no percentual de germinação, não houve diferença significativa para esta variável entre os tratamentos sementes infectadas com Pst e sementes não infectadas (testemunha). O óleo essencial de tomilho se destacou por causar maior redução na germinação das sementes tratadas nos dois experimentos. Os tratamentos com termoterapia e com óleo essencial de citronela não diferiram entre si e da testemunha em ambos os experimentos (Tabela 3). É importante destacar que, com exceção do tratamento composto por óleo essencial de tomilho, todos os outros proporcionaram uma porcentagem de germinação acima da mínima exigida para produção e comercialização de sementes certificadas de tomate, que é de 70% (ANUÁRIO, 2017).

Tabela 3 – Porcentagem de germinação de sementes de tomate Santa Cruz Kada® (ISLA) submetidas ao tratamento com óleos essenciais e termoterapia.

Tratamentos	Experimento 1		Experimento 2	
	$\arcsen\sqrt{(x/100)}^1$	% ²	$\arcsen\sqrt{(x/100)}^1$	% ²
Leite em pó	66,50 b	84,00	70,40 a	88,50
Óleo essencial de citronela 1%	72,15 ab	89,50	72,44 a	90,00
Óleo essencial de tomilho 2%	47,64 c	54,50	43,56 b	47,50
Termoterapia 50°C/30'	76,47 ab	94,00	74,19 a	92,50
Termoterapia 50°C/25'	74,75 ab	92,50	74,70 a	92,00
Semente com Pst ³	72,11 ab	90,50	73,07 a	91,00
Semente sem Pst ⁴	83,05 a	98,00	79,46 a	95,50
F	19,27**		19,17**	
C.V. (%)	7,26		7,77	
DMS (5%)	11,75		12,45	

** - significativo a 1%

a, b, c... – em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹Dados transformados; ²Dados originais.

³Sementes inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e sem tratamento

⁴Sementes isentas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e sem tratamento

Com relação aos experimentos *in vivo*, foi possível observar diferença significativa entre a altura das plantas provenientes de sementes inoculadas com Pst e daquelas isentas da bactéria, demonstrando que a bactéria pode ter interferido no desenvolvimento das plantas. Em ambos os experimentos, os melhores resultados foram obtidos com o tratamento térmico e o tratamento composto pelo óleo essencial de citronela (1%), não diferindo da testemunha composta por sementes isentas de Pst. Já o tratamento composto por óleo essencial de tomilho 2% interferiu negativamente no desenvolvimento das plantas, resultando em plantas significativamente menores que aquelas observadas nos outros tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Altura das plantas (em cm) aos 21 dias após a germinação de sementes de tomate Santa Cruz Kada® (ISLA), submetidas ao tratamento com óleos essenciais e termoterapia.

Tratamentos	Experimento 1	Experimento 2
	Altura (cm)	Altura (cm)
Termoterapia 50°C/25'	18,75 a	20,75 a
Óleo essencial de citronela 1%	19,75 a	21,00 a
Óleo essencial de tomilho 2%	9,00 b	10,00 b
Semente sem Pst ¹	23,00 a	22,75 a
Semente com Pst ²	5,75 b	7,00 c
F	39,50**	123,34**
C.V. (%)	15,54	8,00
DMS (5%)	5,17	2,85

** - significativo a 1%

a, b, c... – em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

¹Sementes isentas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e sem tratamento

²Sementes inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e sem tratamento

Muitas vezes, a presença de patógenos nas sementes não interfere na germinação destas, porém pode alterar o vigor das plantas. De acordo com Couto et al. (2004), a presença de fungos e bactérias em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) não proporcionou redução significativa na germinação. Ramos et al. (2014) observaram que sementes de milho infectadas por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, sob diferentes níveis de infecção, não tiveram sua germinação alterada, porém o vigor foi reduzido.

A semente com baixa incidência de patógenos pode germinar quando semeada em condições ambientais favoráveis. Porém, se o ambiente for adverso, a germinação é lenta, permitindo que patógenos infectantes colonizem a semente e a plântula em desenvolvimento, podendo até causar a morte das mesmas (CASA et al., 1995). Isso acontece devido ao rápido desenvolvimento e à alta agressividade de alguns patógenos latentes na semente, que retomam sua atividade assim que se

deparam com condições favoráveis, matando a semente antes dos primeiros indícios de germinação (MENTEN, 1995b).

De acordo com Carvalho (1997), alguns patógenos não alteram a germinação das sementes quando estes estão colonizando-as, mas provocam perdas no vigor, causando redução no rendimento quanto à sua produção no campo. Diante disso, foi possível entender o resultado deste trabalho, onde sementes infectadas com Pst não tiveram a taxa de germinação reduzida, porém tiveram seu vigor diminuído.

Quanto ao uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos em sementes, é importante ressaltar que, apesar do seu grande papel na agricultura sustentável, esses compostos vegetais podem influenciar processos fisiológicos da planta, prejudicando a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas, devendo, portanto, ser avaliadas as condições que conferem uma boa germinação das sementes no campo (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Embora o tratamento com óleo essencial de tomilho tenha erradicado Pst das sementes de tomate, ele não representa uma alternativa viável de controle, visto que reduz a germinação, e o tratamento de sementes tem como objetivos principais erradicar ou reduzir aos mais baixos níveis possíveis, os patógenos presentes nas sementes; promover condições de uniformidade na germinação e promover o estabelecimento inicial da lavoura com uma população ideal de plantas (FRANÇA NETO, 2009). Jardinetti et al. (2011) também verificaram redução na germinação de sementes de milho quando submetidas ao tratamento com óleo essencial de tomilho.

O presente trabalho revelou que tratamento com o óleo essencial de citronela não afetou a germinação das sementes de tomate, fato já não observado por Corlett, Adamoli e Balbinotti (2015), que verificaram redução na germinação de sementes de feijão quando tratadas com esse mesmo óleo em concentrações acima de 5%.

Segundo Reigosa, Sanchez-Moreiras e Gonzales (1999), as concentrações dos óleos essenciais determinam os efeitos dos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos de uma planta. Para Teixeira (2005), a ação destas substâncias aleloquímicas não é muito específica, portanto, uma mesma substância pode desempenhar várias funções, de acordo com sua concentração e forma de translocação na planta. Alves et al. (2004) estudaram os efeitos do óleo de canela em tratamento de sementes de alface e verificaram que a germinação foi favorecida

quando concentrações baixas do óleo foram utilizadas, porém concentrações intermediárias e altas inibiram o percentual germinativo.

Segundo Bonna (2012), os óleos essenciais possuem uma grande variedade de compostos químicos, o que dificulta atribuir um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana. Mas é sabido que esses óleos afetam a estrutura da parede celular, coagulando e desnaturando proteínas e alteram a sua permeabilidade, levando à interrupção de processos vitais e à lise.

A ausência de efeitos negativos da termoterapia sobre a germinação constatada neste trabalho concorda com os resultados de diversos autores que empregaram a técnica no tratamento de sementes. Braga et al. (2010) concluíram que a termoterapia (água quente a 55°C/30 min) é uma opção consistente para o controle de fungos associados às sementes de tomate, sem prejudicar o potencial fisiológico das sementes, dependendo da qualidade inicial do lote. Costa et al. (2011) verificaram que o tratamento à temperatura de 50°C por 30 minutos de sementes de tomate cereja não interfere na germinação e nem no vigor das mesmas. Schneider (2012), adotando as temperaturas de 45°C, 50°C e 55°C por 15 minutos, observou que a germinação e a integridade das membranas das sementes de pinhão-mansão não são prejudicadas pelo tratamento térmico.

Vale ressaltar a importância de se conhecer a condição fisiológica das sementes antes de se tomar a decisão de submetê-las ao tratamento térmico. Alguns fatores podem interferir nos resultados da termoterapia, como o tipo e procedência das sementes, ou seja, efeitos variáveis do tratamento térmico podem ser observados em relação a diferentes cultivares de uma mesma espécie ou diferentes lotes de um mesmo cultivar (GROOT et al., 2006), além das condições climáticas da região onde as sementes foram produzidas. Outro fator a ser considerado é a condição fisiológica das sementes, isto é, sementes mais vigorosas, assim como sementes dormentes, são mais tolerantes a temperaturas elevadas do que sementes com vigor comprometido e não dormentes (TOITE; HERNANDES-PERES, 2005).

A presença da bactéria *Pst* nas sementes de tomate proporcionou uma redução na altura das plantas. Tal fato foi observado por Cruciol e Costa (2017), que verificaram que a inoculação de *Macrophomina phaseolina* em sementes de soja resultou em altura de plântulas reduzida, quando comparadas com a testemunha composta por sementes sadias.

Com relação ao desenvolvimento das plantas originadas de sementes submetidas à termoterapia, os resultados do presente trabalho concordam com Machado (2000), no sentido em que o binômio temperatura/tempo de exposição de 50°C/25' não altera o vigor das plantas. Por outro lado, Domingues (2006), utilizando o tratamento térmico para controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *zingiberi* em sementes de gengibre a 50°C/30', verificou que essa combinação temperatura/tempo de exposição não afetou a altura das plantas. Já Santos et al. (2016) expondo sementes de soja à termoterapia na temperatura de 40°C por 50 minutos, percebeu que as plântulas apresentaram redução em seu tamanho, devido ao tempo de exposição em que a semente foi submetida.

O crescimento e desenvolvimento de plântulas, segundo Taiz e Zeiger (2007), são comprometidos pela diminuição nas atividades enzimáticas e/ou diminuição na absorção de água, causadas quando a semente sofre um grau moderado de estresse, como o térmico, por isso a importância de se conhecer bem a combinação temperatura/tempo que deve ser empregada e o tipo de semente a ser tratada.

Com relação aos óleos essenciais, os resultados obtidos para o óleo essencial de citronela concordam com aqueles de Pereira et al. (2016), que, avaliando o efeito deste óleo essencial na qualidade das mudas de *Schinus molle*, não observaram interferência na altura das plantas. Por outro lado, Brito et al. (2012) observaram drástica redução na germinação e vigor de sementes de milho tratadas com óleos de citronela em relação à testemunha. A eficiência do tratamento com óleos essenciais pode ser influenciada pelos óleos essenciais empregados, a composição destes, a microflora presente nas sementes e as condições de ambiente.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, permitem concluir que a termoterapia (50°C/25' e 50°C/30') e a aplicação de óleo essencial de citronela a 1% são alternativas viáveis para o tratamento de sementes de tomate infectadas com Pst, uma vez que erradicaram a bactéria das sementes tratadas, sem prejudicar a germinação e o vigor destas. Estudos adicionais se fazem necessários para o óleo essencial de tomilho, pois na concentração testada (2%), há erradicação da bactéria, mas também a redução da germinação e vigor.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade Paulista de Ciências Agrárias, Botucatu, 2006.
- ALVARENGA, M.A.R. **Tomate**. Produção em campo, casa de vegetação e em hidroponia. Lavras: Ed. UFLA, 2004. 400p.
- ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.
- AMORIM, E.P.R.; ANDRADE, F.W.R.; MORAES, E.M.S.; SILVA, J.C.; LIMA, R.S.; LEMOS, E.E.P. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia Solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, p.392-398, 2011.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS 2017. Para abrir o apetite. p.51 Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/flip/anuario-hortalicas-2017/files/assets/basic-html/page51.html>. Acesso em 10 abr, 2018
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; INDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N.K. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 237p.
- BARD, M.; ALBRECHT, M.R.; GUPTA, N.; GUYNN, C.J.; STLLLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. **Lipids**, v.23, p.534-538, 1988.
- BASHAN, Y.; ASSOULINE, I. Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. **Phytoparasitica**, v.11, p.87-193, 1983.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: **Layer Studio Gráfico e Editora Ltda**, 2009.
- BONNA, T.D.M.M. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, p.411-418, 2012.
- BRAGA, M.P.; OLINDA, R.A.; HOMMA, S.K.; DIAS, C.T.S. Relações entre tratamento térmico, germinação, vigor e sanidade de sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.101-110, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria de Defesa Agropecuária**: Brasília, 2009. 395p.

BRITO, D.R.; OOTANI, M.A.; RAMOS, A.C.C.; SERTÃO, W.C.; AGUIAR, R.W. de S. Efeito dos óleos de citronela, eucalipto e composto citronela sobre micoflora e desenvolvimento de plantas de milho. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.184-192, 2012.

BURT, S. A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.162-167, 2004.

CARMO, M.G.F.; CORREA, F.M; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A.O; ROSSETO, C.A.V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p.579-584, 2004.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.50-62, 2006.

CARVALHO, M. V. **Ocorrência, contágio e associação em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 1997. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; MEDEIROS, C.A.; MOURA, B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicida, na proteção de fungos do solo no Rio Grande do sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, n.4, p.633-638, 1995.

COLARICCIO, A. Serviço de informação estatística agrícola de São Paulo. **Instituto de Economia Agrícola**, v.13, n.1, p.136, 2002.

CORLETT, F.M.F.; ADAMOLI, H.J.; BALBINOTTI, A.P.R. Efeito de óleos essenciais citronela e nim na germinação de sementes de feijão crioulo orgânico cultivados no município de Pelotas, RS. **Cadernos de Agroecologia**, 2015.

COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.2, p.11-14, 2008.

COSTA, I. J.S; SOARES, E.P.S.; SALES, N.L.P.; AZEVEDO, D.M.Q.; ROCHA, A.P.; AQUINO, C.F. Tratamento de sementes de tomate cereja visando sanidade e germinação através da termoterapia. **Cadernos de Agroecologia**, v.6, n.2, 2011.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Arvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. The mode of antimicrobial action of the

essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.1, p.170-175, 2000.

CRUCIOL, G.C.D.; COSTA, M.L.N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.337-343, 2017.

DHINGRA, O.D.; MUCHOVEJ, J.J; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de sementes**. Controle de patógenos. Viçosa: UFV, 1980. 607p.

DOMINGUES, F. **Controle Físico e Biológico de *Fusarium oxysporum* f. *zingiberi* em gengibre**. 2006. 59p. Dissertação (mestrado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DOSSA, D.; FUCHS, F. Tomate: análise técnico-econômica e os principais indicadores da produção nos mercados mundial, brasileiro e paranaense. (Boletim Técnico 03). 2017. Disponível em: http://www.ceasa.pr.gov.br/arquivos/File/BOLETIM/Boletim_Tecnico_Tomate1.pdf Acesso em: 10 abr., 2018.

ESTEFANI, R.C.C.; MIRANDA FILHO, R.J; UESUGI, C.H. Tratamento térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade fisiológica das sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.5, p.434-438, 2007.

FATMI, M.; SCHAAD, N. W.; BOLKAN, H. A. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seed. **Plant Disease**, v.75, p.382-385, 1991.

FRANÇA NETO, J.B. Evolução do conceito de qualidade de sementes. **Informativo Abrates**, v. 19, n. 2, p. 76-80, 2009.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. da S.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M.P.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, p.29-38, 2007.

GAUR, R.B.; SHARMAM, R.N. Biocontrol of root rot in cotton and compatibility of potential bioagents with fungicides. **Indian Journal of Plant Protection**, v.38, p.176-182, 2010.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.1, p.1-9, 2006.

GOULART, A.C.P. **Tratamento de sementes de soja com fungicidas: recomendações técnicas**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1998. 32p. (Circular Técnica, 8), 1998.

GRONDEAU, C.; LADONNE, F.; FOURMOND, A. Attempt to eradicate *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea seeds with heat treatments. **Seed Science & Technology**, v.20, p.515-525, 1992.

GRONDEAU, C.; SAMSON, R. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, n.1, p.57-75, 1994.

GROOT, S.P.C.; BIRNBAUM, Y.; ROP, N.; JALINK, H.; FORSBERG, G.; KROMPHARDT, C.; WERNER, S.; KOCH, E. Effect of seed maturity on sensitivity of seeds towards physical sanitation treatments. **Seed Science and Technology**, v.34, p.403-413, 2006.

HERMAN, M.A.B.; DAVIDSON, J.K.; SMART, C.D. Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatos. **Phytopathology**, v.98, p.1226–1232, 2008.

IKUTA, J. Tratamento térmico de sementes e de tecidos de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infectados por *Clavibacter michiganense* subsp *michiganense* (Smith) Davis et al. e efeito de diferentes temperaturas sobre a bactéria cultivada “in vitro”. 1990. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1990

JARDINETTI, V.A.; CRUZ, M.E.S.; MAIA, A.J.; OLIVEIRA, J.S.B.; SANTOS, E.M.; Efeito de óleos essenciais no controle de patógenos na germinação de sementes de milho (*Zea mays*). In: **VII Encontro Internacional de Produção Científica**, Maringá – PR, 25-28 out. 2011.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.96-97, 1970.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I.E. Defense responses of plants to pathogens. **Advances Botanical Research**, v.21, p.1-34, 1995.

KRITZINGER, Q., AVELING, T.A.S.; MARASAS, M.F.O. Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.30, n.3, p. 609-619, 2002.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.2. p.607-626. 2005.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. ;REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.690- 719, 1997.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 151p.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p.53-74.

LOPES, C.A.; REIS, A.; ÁVILA, A.C. Principais doenças do tomate para a mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. Informe Agropecuário, v.24, n.219, p.66-78, 2003)

LUCAS, G.C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 93p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: Editora UFLA. 2000.

MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: CATELLANE, P.D.; BRAS, L.T.; CHURATA-MASCA, M.G.C. (Coords.). ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE TOMATE, Anais..., Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.165.

MARTINS, E.S.C.S.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; FARIAS, M.A.A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.3, p.29-34, 2009.

MBEGA, E.R.; MABAGALA, R.B.; MORTENSEN, C.N.; WULFF, E.G. Evaluation of essential oils as seed treatment for the control of *Xanthomonas* spp. associated with the bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. **Journal of Plant Pathology**, v.94, n.2, p.273-281, 2012.

McMILLAN Jr, R.T. Preplant seed treatment of tomato for control of *Xanthomonas campestris* (Pamm.) Dows. pv. vesicatoria (Doidge) Dye. Acta Horticulturae, n.198, p.53-58, 1987. Disponível em: http://www.actahort.org/books/198/198_6.htm
Acesso em: 9 abr. 2018

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; GABRIEL JR, M.R.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. e P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.83-90, 2007.

MENDES, M.A.S; LIMA, P.M.M; FONSECA, J.N.L.; SANTOS, M.F. Erradicação de *Fusarium oxysporum* em sementes de alfafa utilizando termo e quimioterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.148-152, 2001.

MENTEN, J.O.M. Importância do tratamento de sementes. In: **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: FEALQ, 1995a. p. 203–217

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. (Ed.) **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1995b. p.203-224.

MORAES, M.H.D. Análise de sementes tratadas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestra...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.99.

MORAIS, L.A.S.; RAMOS, N.P.; GONÇALVES, G.G.; BETTIOL, W.; CHAVES, F.C.M. Atividade antifúngica de óleos essenciais em sementes de feijão cv. carioquinha. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2 (Supl.), p.S6261-S6266, 2008.

MORAIS, L.A.S.; SILVA, M.A.S.; GONÇALVES, M.A.; SILVA, S.M.P.; CARDOSO, A.I.I. Interferência de extratos de alho na germinação e no vigor de sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, v.19, p.345-349, 2001.

MUNIZ, M.F.B. Control of microorganisms associated with tomato seeds using thermotherapy. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.176-280, 2001.

NEEGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan, 1979. 839p.

NÜRNBERGER, T.; NENNSTIEL, D.; JABS, T.; SACKS, W.R.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell**, v.78, p.449-460, 1994.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the nonpathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.2, p.195-197, 2010.

ORDOÑEZ LOZADA, M.I. **Eficiência de óleos essenciais para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cepae* em sementes de cebola e seu efeito na qualidade fisiológica**. 2016. 86 f., Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PEREIRA, K.C.; REDA, F.R.; PIVETA, G.; GARCIA, F.A.O. Avaliação de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes e mudas de *Schinus molle*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.36, n.85, p.71-78, 2016.

PEREIRA, R.B. **Óleos essenciais no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro**. 2008. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O.L.; SANTIAGO, E.J.A. de; SILVA, F.G. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222p.

PIPER, P.; CALDERON, C.O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635–2642, 2001.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*.

Phytochemistry, v. 63, p. 569–575, 2003.

RAMOS, D.P.; BARBOSA, R.M.; VIEIRA, B.G.T.L.; PANIZZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.44, n.1, p.24-31, 2014.

REIGOSA, M. J.; SANCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZALES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v.18, n.5, p.577-608, 1999.

ROMERO, A.L et al. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, n.4, p.15-18, 2009.

ROMERO, A.L ; ALMEIDA, A.L. de ; OLIVEIRA, R.R. ; VIDA, J.B. Composição química e avaliação das atividades antifúngica e alelopática dos óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Illicium verum*. In: IV CONCCEPAR - Congresso Científico da Região Centro Ocidental do Paraná, 2011, Campo Mourão. **Anais...** , 2011, p.112.

SAKO, Y.; McDONALD, M.B.; FUJIMURA, K.; EVANS, A.F.; BENNETT, M.A. A system for automated seed vigour assessment. **Seed Science and Technology** v.29, p.625-636, 2001.

SANTOS, A.; PADUAN, R.H.; GAZIN, Z.C.; JACOMASSI, E.; D' OLIVEIRA, P.S.; CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L.E.R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2, p.436-441, 2009.

SANTOS, F.F.B. **Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao *Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)***. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2009.

SANTOS, L.A; FARIA, C.M.D.R.; MAREK, J.; DUHATSCHEK, E.; MATINICHEN, D. Radioterapia e termoterapia como tratamentos de sementes de Soja. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v.9, n.2, p.37-44, 2016.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

SCHNEIDER, C. F. **Avaliação da termoterapia na qualidade fisiológica e sanitária em sementes de pinhão-manso armazenadas**. Dissertação. Universidade estadual do oeste do Paraná, 39p. 2012.

- SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.
- SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.11, p.8022-8, 1994.
- SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.201-22, 1995.
- SILVA, A.M.S.; CARMO, G.F.; OLIVARES, F.L.; PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, p.586-593, 2002.
- SILVA, E.O.; MARTINS, S.J.; ALVES, E. Essential oils for the control of bacterial speck in tomato crop. **African Journal of Agricultural Research**, v.34, p.2624-2629, 2014.
- SILVA, V.L.; LOPES, C.A. Populações epifíticas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em cultivo comercial de tomateiro industrial. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.179-183, 2005.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p.467-495.
- SOUZA, S.M.C.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.685-690, 2004.
- STOCKINGER, E. J.; WALLING, L. L. Pto3 e Pto 4: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.879-994, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918p, 2013.
- TEDESCO, V.; DENARDIN, N.D.; QUADROS, M.A.; DE BONI, J.; PASSOS, S. Termoterapia no tratamento de sementes de feijoeiro para erradicação de *Xanthomonas axonopodis* pv; . *phaseoli* var. *fuscans*. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 8. **Resumos**, João Pessoa, Tropical Hotel Tambau, 2004. p 236.
- TEIXEIRA, M. G. **Efeito alelopático de extratos alcoólicos cravo-da-índia, canela e noz moscada sobre a germinação de algumas sementes de interesse agrônomo**. 2005. 67p. Monografia, Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), São Paulo, 2005.

TOITE, L.J. du; HERNANDEZ-PEREZ, P. Efficacy of hot water and chlorine for eradication of *Cladosporium variable*, *Stemphylium botryosum*, and *Verticillium dahliae* from spinach seed. **Plant Disease**, v.39, p. 1305-1312, 2005.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4606-4610, 1999.

VANZOLINI, S.; TORRES, R.M.; PANIZZI, R.C. Efeito do tamanho, da densidade e do tratamento fungicida sobre a qualidade de sementes de amendoim. **Revista Ceres**, v.47, p. 603, 2000.

VARVARO, L.; PIETRARELLI, G. B. L. Effects of simulated rain on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato plants. **Journal of Plant Pathology**, v.88, p.245–251, 2006.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B.; HOMECHIN, M. Ocorrência e transmissão de *Alternaria steviae* e *A. alternata* em sementes de *Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni. **Revista Brasileira de Sementes**, v.19, n.2, p.283-287, 1997.

VIGO-SCHULTZ, S. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n 4, p 515-524, 2006.

ZAMBOLIM, L. Importância do tratamento de sementes no manejo integrado de doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, PB. **Palestras...**, João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, p.94-94, 2004.