

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS PATO BRANCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

SABRINA SANTOS GUIMARÃES

POTENCIAL DE PREPARADOS DE CAVALINHA (*Equisetum sp.*) NA  
SÍNTESE DE METABÓLITOS DE DEFESA EM COTILÉDONES DE  
SOJA (*Glycine max L.*) E O EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO  
DE *Rhizoctonia solani*, *IN VITRO*.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PATO BRANCO  
2012



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**CÂMPUS PATO BRANCO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**SABRINA SANTOS GUIMARÃES**

**POTENCIAL DE PREPARADOS DE CAVALINHA (*Equisetum sp.*) NA  
SÍNTESE DE METABÓLITOS DE DEFESA EM COTILÉDONES DE  
SOJA (*Glycine max L.*) E O EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO  
DE *Rhizoctonia solani*, *IN VITRO*.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PATO BRANCO**

**2012**

**SABRINA SANTOS GUIMARÃES**

**POTENCIAL DE PREPARADOS DE CAVALINHA (*Equisetum sp.*) NA  
SÍNTESE DE METABÓLITOS DE DEFESA EM COTILÉDONES DE  
SOJA (*Glycine max L.*) E O EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO  
DE *Rhizoctonia solani*, *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Co-orientador: Dr Américo Wagner Junior

**PATO BRANCO**

**2012**

Catálogo na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

G963p Guimarães, Sabrina Santos

Potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro*. / Sabrina Santos Guimarães – 2012.

37f. : il. ; 30 cm

Orientador: Sérgio Miguel Mazaro

Co-orientador: Américo Wagner Júnior

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2012.

Bibliografia: f. 24-29

1.Fitoalexinas. 2.Fenilalanina amonia liase. 3.Fenóis totais. 4.Efeito Fungistático . I.Mazaro, Sérgio, Miguel, orient. II.Wagner Júnior, Américo, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV.Título.

CDD(22. ed.) 630



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Pato Branco  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 062

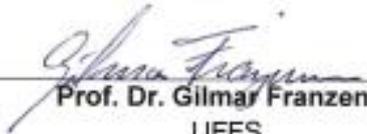
**Potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia Solani*, *in vitro*.**

por

**Sabrina Santos Guimarães**

Dissertação apresentada às nove horas do dia trinta de março de dois mil e doze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. *aprovado*.....

Banca examinadora:

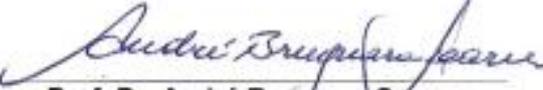
  
Prof. Dr. Gilmar Franzener  
UFFS

  
Prof. Dr. Américo Wagner Junior  
UTFPR/DV

  
Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da  
Silva  
UTFPR/DV

  
Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaró  
UTFPR  
Orientador

Visto da Coordenação:

  
Prof. Dr. André Brugnara Soares  
Coordenador do PPGAG

## **AGRADECIMENTOS**

Essa é, sem sombra de dúvida, uma das partes mais importantes nesse trabalho, onde expressamos com muito carinho o reconhecimento pela ajuda prestada durante o desenvolvimento desse projeto, penso que provavelmente possa vir a não mencionar alguém que pode ter vindo a desempenhar um papel de suma importância, nesse sentido, peço, antecipadamente, minhas sinceras desculpas deixando explícita minha imensa gratidão pelo auxílio e compreensão.

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro pela paciência, e o exímio trabalho desenvolvido durante todo o curso e principalmente pela sua amizade e exemplo de amor e dedicação;

Ao colega Alvaro Freddo pelo auxílio prestado, a prontidão sempre que solicitado e pela sua amizade;

Ao Prof. Dr. Américo Wagner Junior pela co-orientação;

Aos meus amigos e a minha família em especial ao meu pai, Itamar Luis Guimarães; ao meu irmão, Jéferson Santos Guimarães; e ao meu namorado, Emerson Tiago Taffarel, que sempre se fizeram presentes, apoiando e animando, compreendendo, com paciência e carinho, e, pelo amor, visto que sem isso, minha conclusão não seria possível.

A minha mãe, Maria Margareth Santos, que mesmo não estando presente fisicamente, está sempre em meus pensamentos, incentivando e dando-me a força e a coragem que me faltam nos momentos mais difíceis, com seu exemplo de fé, amor, dedicação, persistência e superação;

Agradeço aos demais professores da instituição, aos colegas, aos estagiários dos laboratórios e aos laboratoristas e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o sucesso desse trabalho.

## RESUMO

GUIMARAES, Sabrina Santos. Potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro*. 2012. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2012

O controle de doenças em plantas geralmente é realizado com o uso de agroquímicos, que podem desencadear efeitos maléficos ao ser humano ou ao ambiente como um todo. Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de ativar o metabolismo de defesa das plantas, como o acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com características elicitoras. Foram desenvolvidos dois experimentos na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus de Dois Vizinhos, com objetivos de avaliar o potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro*. O delineamento experimental utilizado para os experimentos foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5 resultante da combinação de três formas de extração (extrato alcoólico, infusão e maceração) e cinco concentrações (zero; 1; 10, 20 e 40%), com 4 repetições. No primeiro experimento foi avaliada a indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta aos derivados a base de cavalinha. Sementes de soja foram semeadas em areia autoclavada e mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. Em seguida os cotilédones das plântulas foram removidos e na face abaxial destes foram aplicados os tratamentos. Após seguir os procedimentos metodológicos da técnica de extração, obteve-se via espectrofotometria a quantificação da fitoalexina gliceolina, sendo então utilizados os cotilédones para quantificação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) e o teor de fenóis totais. No segundo experimento foi avaliado o potencial fungistático dos preparados sobre *Rhizoctonia solani*. Em placas de Petri foram adicionados no meio de cultura BDA os preparados nas diferentes concentrações. Após a solidificação foi transferido para o centro de cada placa, um disco de micélio com *Rhizoctonia solani*. As placas foram incubadas sob alternância de fotoperíodo de 12 horas, em temperatura de 25°C. Os preparados de extrato alcoólico, infusão e maceração de cavalinha apresentam capacidade de indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, bem como, ativam o metabolismo de compostos fenólicos. Entre os preparados, o extrato alcoólico e a maceração, se sobressaem sobre a infusão. Os preparados de extrato alcoólico, infusão e maceração de cavalinha em todas as suas concentrações inibem o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*, *in vitro*, sendo que o extrato alcoólico apresenta maior capacidade de supressão do crescimento micelial em comparação as demais formas de obtenção dos preparados.

**Palavras-chave:** Fitoalexinas. Fenilalanina amônia liase. Fenóis totais. Efeito Fungistático.

## ABSTRACT

GUIMARAES, Sabrina Santos. Potential cavalinha (*Equisetum* sp.) prepared on the metabolites defense synthesis using soybean cotyledons (*Glycine max* L.) and the effect on *Rhizoctonia solani* growth, *in vitro*. 2012. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2012

Usually, the plant diseases control is accomplished with the use of chemicals products that can trigger harmful effects for the people or the environment. Several studies showed the potential of medicinal plants in the control of pathogens, either by their direct fungitoxic action, inhibiting the mycelial growth and spore germination, and by ability to activate the metabolism of plant defense, such as phytoalexin accumulation, indicating the presence of molecules with characteristics elicitoras. Two experiments were carried out in the Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos. The aims of these works were to evaluate the potential of "cavalinha" (*Equisetum* sp.) prepared in the defense metabolites synthesis of soybean cotyledons (*Glycine max* L.) and the effect on *Rhizoctonia solani* growth *in vitro*. The experimental design used for the experiments was completely randomized in factorial 3 x 5 (extract form x concentration), with four replications. The extract forms were alcoholic extract, infusion and maceration and the concentrations tested were zero, 1, 10, 20 and 40%. In the first experiment, the phytoalexins induction in the soybean cotyledons the according with "cavalinha" prepared was evaluated. Soybean seeds were sown in autoclaved sand and kept at room temperature for 10 days. After, the plantlets cotyledons were removed and on the surface of these the treatments were applied. Then, it followed the methodological procedures of extraction technique and it was obtained via spectrophotometry the phytoalexin glyceollin quantification. The cotyledons were then used to quantify of the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and total phenols contend. In the second experiment was evaluated the potential fungistatic preparations on *Rhizoctonia solani*. The prepared with different concentrations was added in Petri dishes with PDA culture medium. After solidification was transferred to the center of each plate, a disc with *Rhizoctonia solani* mycelia. The plates were incubated alternating the photoperiod in 12 hour, at 25 °C temperature. The alcoholic extract, infusion and maceration "cavalinha" prepared present glyceolin induction of phytoalexins in soybean cotyledons, as well as it to activate the metabolism phenolic compounds. Among the prepared, the alcoholic extract and maceration forms were superior in relation the infusion form. The alcoholic extract, infusion and maceration "cavalinha" prepared using all over the concentrations inhibit *Rhizoctonia solani* growth *in vitro*. The alcoholic extract had a higher capacity to suppress mycelial growth compared to other forms of production preparations.

Keywords: Phytoalexins. Phenylalanine ammonia lyase. Phenols. Fungistatic effect.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Aplicação de tratamentos em cotilédones de soja, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011 ..... 14
- Figura 2 – Inserção dos discos de micélio com *Rhizoctonia solani* sobre os meios de cultura após solidificação, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011 ... 15
- Figura 3 – Placas (testemunha) onde o fungo *Rhizoctonia solani* cresceu até a borda da placa, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011..... 16
- Figura 4 - Teor de proteínas em cotilédones de soja em função das diferentes concentrações dos preparados de *Equisetum sp.*, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 ..... 18
- Figura 5: Efeito fungistático *in vitro* sobre *R. solani*, com a aplicação de cinco concentrações de extratos infuso, alcoólico e macerado de *Equisetum sp.*, 14 dias após a incubação, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 ..... 21

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 GERAIS.....	3
2.2 ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS .....	4
3.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTA E FITOALEXINAS.....	7
3.3 CARACTERÍSTICAS DA CAVALINHA ( <i>Equisetum</i> sp) NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.....	9
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA <i>Rhizoctonia</i> sp.....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
4.1 INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA EM COTILÉDONES DE SOJA EM RESPOSTA A EXTRATOS DE <i>Equisetum</i> sp	13
4.2 EFEITO FUNGISTÁTICO <i>in vitro</i> DE PREPARADOS DE <i>Equisetum</i> sp	15
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas estão expostas a uma ampla gama de patógenos causadores de doenças que em sua maioria são controladas mediante utilização de agroquímicos que podem desencadear efeitos maléficos ao meio ambiente e a saúde de agricultores e consumidores.

Diversos trabalhos mostram o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de ativar o metabolismo de defesa das plantas, como o acúmulo de fitoalexinas, indicando a presença de moléculas com características elicitoras. A cavalinha pertence a família das Equisetaceae, nativa do Continente Americano e distribuída por todo território brasileiro, principalmente na região sul, podendo atingir aproximadamente 130 cm de altura. É uma planta medicinal usada no tratamento de doenças reumáticas, cálculos renais e demais infecções do trato urinário, anemias, inchaços e hemorragias. Seus extratos são amplamente utilizados na agricultura orgânica e outros sistemas de agricultura alternativos, devido a sua fácil obtenção e ao seu alto teor de Silício conferir-lhe ação fitoprotetora. Além de avaliar a utilização de extratos de cavalinha no controle de fitopatógenos e na indução de metabólitos de defesa é importante saber quais as concentrações da planta capazes de desencadear atividade significativa, visto que quanto menor a quantidade da planta a ser utilizada, maior a praticidade na elaboração dos extratos, evitando assim a manipulação e a necessidade de grandes volumes de plantas para elaboração de preparados a serem utilizados no campo, por exemplo.

Diversos estudos demonstram resultados significativos na utilização dos extratos de cavalinha no controle de fungos fitopatogênicos e indução de metabolismo de defesa (CUNICO et al., 2004; AMARAL e BARA, 2005; BRAND et al., 2006; SOUZA, ARAUJO e NASCIMENTO 2007; CELOTO et al., 2008; ITAKO et al., 2008; GONÇALVES, MATTOS e MORAIS 2009; SILVA et al., 2009, CAMATTI-SARTORI et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; VENTUROSOSO et al., 2011). Estudo desenvolvido por Padilha et al., (2007), repetido nesse trabalho afim de fornecer material para as quantificações bioquímicas nele desenvolvidas, relatou o potencial da cavalinha no processo de indução de resistência em plantas. As fitoalexinas são

metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana. Esses compostos apresentam importantes ações na proteção contra uma ampla gama de patógenos, dentre eles os fungos fitopatogênicos. Em soja, a fitoalexina gliceolina mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo a utilização de seus cotilédones uma ferramenta usada para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica.

Além da quantificação de fitoalexinas, a identificação da ativação de rotas de defesa vegetal é importante para o desenvolvimento de estratégias para defesa vegetal. Como a quantificação de proteínas, compostos fenólicos e fenilalanina amônia-liase (FAL). Os compostos fenólicos são responsáveis por uma grande diversidade de funções nos vegetais, são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão de sua heterogenicidade. Os compostos fenólicos mais abundantes são derivados da fenilalanina, por meio de eliminação de amônio para formar ácido transcinâmico. Essa reação é catalizada pela FAL, que é a enzima chave na indução de resistência, por estar diretamente envolvida no metabolismo de fenilpropanóides.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1. GERAL:

Avaliar o potencial de preparados de Cavalinha (*Equisetum sp.*) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max L.*) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *in vitro*.

### 2.2. ESPECÍFICOS:

Avaliar diferentes formas de extração e concentrações de preparados à base de cavalinha como potencial em ativar mecanismos de defesa sendo eles através da síntese de fitoalexinas, fenóis e/ou atividade da enzima fenilalanina-amoniolase em cotilédones de soja;

Avaliar o efeito de diferentes formas de extração e concentrações de preparados à base de cavalinha sobre *Rhizoctonia solani*, *in vitro*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

O uso de produtos químicos para o controle de doenças em plantas tem sido amplamente questionado como consequência de seus efeitos nocivos ao ser humano, animais e ao meio ambiente como todo, bem como ao aumento da resistência das pragas e doenças aos agroquímicos utilizados, proporcionando aumento na demanda por produtos livres de agrotóxicos, representando nova oportunidade de mercado (SILVA et al., 2006). O incremento da produção orgânica gerada por essa demanda cria a necessidade de novas tecnologias e produtos que viabilizem esse modelo de produção.

Entre as muitas táticas utilizadas pelos produtores, o uso de plantas e seus metabólitos secundários vêm recebendo atenção especial. Cabe lembrar, que as propriedades das plantas são dependentes de sua constituição química, e que essa pode ser influenciada por uma série de fatores como: idade e estágio vegetativo da planta, pH do solo, estação do ano entre outros. (SILVA et al., 2006)

Além da atividade inibitória apresentada pelas substâncias naturais, Bettiol et al. (2006) e Carvalho et al. (2009) salientam que a utilização de produtos naturais tornam os produtos mais atrativos ao consumidor, por não apresentarem resíduos tóxicos prejudiciais, não apenas à saúde humana mas também ao meio ambiente, ainda que empregados em quantidades elevadas.

Nesse sentido, a pesquisa vem testando diversos produtos, muitos deles já utilizados pelos agricultores que defendem e acreditam no desenvolvimento da agricultura alternativa. Dentre os métodos alternativos de controle é comum a prática da utilização de extratos vegetais no combate de doenças, como exemplo a utilização de pimenta-do-reino (*Piper nigrum L*), alho (*Allium sativum L*), samambaia (*Pleopeltis pleopeltifolia*) e eucalipto (*Eucalyptus sp.*) (BETTIOL et al., 2006; PAULA JÚNIOR et al., 2006).

Na preparação dos extratos vegetais podem ser usadas plantas secas ou frescas, extraídas de várias formas, como por maceração, infusão e decocção. A maceração consiste em submeter o material vegetal, geralmente triturado, a ação de um líquido extrator por longo espaço de tempo (que pode variar de horas a dias), deixando-se então a mistura em recipiente bem fechado, ao abrigo da luz e a

temperatura ambiente, com ou sem agitação frequente (OLIVEIRA e AKISUE, 2005). As folhas, sementes e partes tenras ficam, em geral, de 10 a 12 horas em contato com a solução extratora (LORENZI e ABREU MATOS, 2008). Na infusão verte-se água fervente sobre o material vegetal, mantendo-o em recipiente fechado por, geralmente, 30 minutos, agitando com frequência (OLIVEIRA e AKISUE, 2005), devendo o material ser preparado e utilizado logo em seguida (LORENZI e ABREU MATOS, 2008). No processo de decocção o líquido extrator é levado à ebulição junto ao extrato vegetal durante tempo pré determinado, sendo em seguida filtrado e resfriado (OLIVEIRA e AKISUE, 2005). Este método é indicado para partes duras da plantas como cascas, raízes e sementes (LORENZI e ABREU MATOS, 2008).

Camatti-Sartori et al. (2011), verificando a atividade de extratos vegetais sobre fungos de flores, observou que a maioria dos extratos botânicos acéticos e alcoólicos avaliados apresentaram algum tipo de inibição contra fungos fitopatogênicos. Carvalho et al. (2002), estudando extratos de plantas como estratégia de controle de doenças fúngicas de Inhame (*Colocasia esculenta*), utilizando Acácia negra (*Acacia mearnsii*), alho (*Allium sativum* L), angico (*Anadenanthera* sp.), aroeira (*Schinus molle* L), café (*Coffea arabica* L), limão (*Citrus aurantifolia*), verificaram que os extratos testados não inibiram o desenvolvimentos de fungos. Ribeiro e Bedendo, (1999), avaliaram o efeito inibitório de extratos de alho (*Allium sativum* L), hortelã (*Mentha piperita* L) e pimenta (*Piper* sp), sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, e observaram inibição da produção de conídios quando foram utilizados os extratos de mamona (*Ricinus communis* L), hortelã e pimenta, enquanto que o extrato de alho inibiu somente o crescimento micelial do fungo. Amaral e Bara (2005), avaliando a atividade antifúngica de extratos de açafrão (*Curcuma longa*), coração-de-negro (*Albizzia lebeck Benth*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), sobre os fitopatógenos: *Fusarium* sp, *Macuphominia* sp, *Rhizoctonia* sp e *Sclerotium* sp, observaram que o óleo de cravo da índia apresentou maior controle dos fungos em comparação aos demais. Fernandes et al. (2011), avaliando a ação de extratos de eucalipto sobre a esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, observaram que os extratos não inibiram o desenvolvimento do fungo.

Venturoso et al. (2011), avaliram extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos, verificaram que as plantas testadas sobressaíram-se os preparados de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), alho (*Allium sativum* L) e

canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Brand et al. (2006), verificando a atividade de extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola (*Allium cepa*), observaram que os extratos de alho (*Allium sativum* L), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*) reduziram a incidência da maioria dos fungos presentes nas sementes de cebola. Gonçalves, Mattos e Morais (2009), testando óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja, concluíram que o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinalis*) na concentração de 20% apresentaram atividade no controle de *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. em grãos de soja.

Itako et al. (2008), ao avaliar a atividade antifúngica e protetora de extratos de plantas medicinais em tomateiro, utilizando *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre *Alternaria solani*, verificaram que os extratos foram promissores para o controle de *A. solani*, agente causal da pinta-preta em tomateiro. Cunico et al. (2004), testando a atividade de extratos obtidos de *Ottonia martiana* sobre três fitopatógenos (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Rhizoctonia* sp.), observaram que os extratos brutos da planta apresentaram atividade antifúngica, principalmente o extrato etanólico de raízes, uma vez que inibiram o crescimento micelial dos fungos em mais de 50%.

Silva et al. (2009), ao avaliar o efeito de extratos de manjeriço, cascas de angico e alho, verificaram que os extratos não tiveram efeito inibitório sobre fusariose do feijão caupi.

Celoto et al. (2008), ao testar a atividade antifúngica de extratos de plantas sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, constataram que os extratos não autoclavados e extratos alcoólicos promoveram maior inibição do crescimento micelial, que os extratos aquoso e hidroetanólico de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L) e o extrato hidroetanólico de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) proporcionaram maiores inibições do crescimento micelial; os extratos aquosos de *Luffa acutangula*, *Eucalyptus citriodora*, *Chenopodium ambrosioides* e *Bauhinia* sp., e os extratos hidroetanólicos de *Ruta graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Zingiber officinale* e *Chenopodium ambrosioides* inibiram em mais de 90% a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*.

Silva e Bastos (2007), avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de dez espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, e observaram que todos os óleos essenciais tiveram ação

fungitóxica significativa sobre os fitopatógenos testados. Souza, Araujo e Nascimento (2007) obtiveram redução de crescimento micelial e germinação de esporos de *Fusarium* sp., ao utilizarem extratos de alho (*Allium sativum* L) e capim-santo (*Cymbopogon citratus*). Além disso, os produtos vegetais controlaram o tombamento e a podridão dos colmos de plântulas de milho (*Zea mays*). Brand et al. (2007) avaliaram os efeitos dos extratos de *Maytenus ilicifolia* sobre *Trichoderma* sp., e observaram que os extratos testados não inibiram o desenvolvimento deste fungo.

Souza e Soares (2009) testaram extratos aquosos de nim e alho sobre *Aspergillus niger* e verificaram que ambos inibiram o crescimento micelial do fungo.

Rosal et al. (2009) ao avaliar a eficiência do uso de extratos aquosos de alvia em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Penicillium* sp., observaram que ao aumentar a concentração dos mesmos, reduziu-se progressivamente o crescimento micelial.

Vigo-Schultz (2006) verificou em seus estudos que a tintura de guaco atuou no controle de *Xanthomonas campestris*, devido a sua atividade antimicrobiana, podendo ser empregada em novos estudos de controle de doenças causadas por fitopatógenos.

### 3.2. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS E FITOALEXINAS

As plantas possuem mecanismo de defesa natural que pode ser dividido em dois grupos, os que estão presentes na planta sem necessidade de contato com agente indutor (pré-formados) e os produzidos em resposta a um agente indutor (pós-formados); esses podem ser divididos ainda em estruturais (barreiras físicas) ou bioquímicos (substâncias ou condições adversas criadas pela planta contra o agente indutor) (ROMEIRO, 2007; SILVA et.al., 2008).

Estes mecanismos de defesa quando induzidos pelo tratamento com agentes de qualquer natureza (bióticos ou abióticos, orgânicos ou não), são capazes de desencadear uma resposta na planta, atuam como indutores de resistência, ou seja, elicitores. (MAZARO et al., 2007; ROMEIRO, 2007).

Esses elicitores podem induzir a resistência sistêmica induzida (RSI) ou a resistência sistêmica adquirida (RSA). Os genes de resistência estão associados com o incremento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET)

(ROMEIRO, 2007). A RSA envolve o acúmulo de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs), e sua indução é salicilato-dependente, podendo dar origem a alterações visuais como necroses, sendo facilmente ativada por ativadores químicos. Por outro lado, a RSI, apresenta-se associada à jasmonatos e etileno (RAVEN et al., 2001; MAZARO et al., 2007, ROMEIRO, 2007). A exposição da planta a esses sinalizadores torna o tempo de resposta da planta mais curto e sua resposta mais eficiente às tentativas de colonização dos patógenos, graças a sua difusão sistêmica ou indução de autogenia (ROMEIRO, 2007).

As fitoalexinas são metabólitos secundários, e compreendem um dos mecanismos de resistência sistêmica (TAIZ e ZEIGER, 2004; MAZARO et al., 2007). Possuem atividade antimicrobiana e constituem uma diversidade de compostos de defesa, pertencentes a diferentes grupos químicos; dentre eles os isoflavonóides e terpenóides, cumarinas, sulfitos, glucosídeos, taninos, purinas, ácidos graxos. Estes compostos podem se acumular até níveis suficientes para limitar o crescimento do patógeno e são tóxicas para protoplastos, células animais, bactérias e fungos e é provável que as fitoalexinas atuem de forma direta sobre o agressor e também causem a morte do tecido infectado (TAIZ e ZEIGER, 2004; GUIMARÃES et al., 2007; BARROS et al., 2010). A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de plantas de ervilha (*Pisum sativum*), sendo que desde sua descoberta, inúmeras fitoalexinas foram obtidas de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada, banana, entre outras (BRAGA, 2007). Em soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja mostra-se como excelente ferramenta para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Esses compostos, são formados nas plantas após o ataque dos patógenos, sua transcrição é controlada por genes de defesa, e podem apresentar importantes ações na proteção contra uma ampla gama de patógenos (BONALDO et al., 2004; TAIZ e ZEIGER, 2004), dentre eles os fungos. O modo de ação sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (CAVALCANTI et al., 2005).

Além da quantificação de fitoalexinas, a identificação da ativação de rotas de defesa vegetal é importante para o desenvolvimento de estratégias para defesa vegetal. Nesse sentido a quantificação de diversas moléculas como os compostos fenólicos e a fenilalanina amonia-liase (FAL) é fundamental.

Os compostos fenólicos são um grupo heterogêneo, com muitos compostos (aproximadamente dez mil compostos). Devido a sua diversidade química, apresentam uma grande diversidade de funções nos vegetais; muitos agem no controle de herbívoros, outros como suporte mecânico, outros na proteção contra raios ultra-violeta, outros ainda protegem a planta de microrganismos patogênicos. Esses compostos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão de sua heterogenicidade. Porém, duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas: a rota do ácido chiquímico (biossíntese da maioria dos fenóis) e do ácido malônico (mais importante em fungos e bactérias e menos significativa para plantas superiores) (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos mais abundantes são derivados da fenilalanina, por meio de eliminação de amônio para formar ácido transcinâmico. Essa reação é catalizada pela fenilalanina amonia-liase (FAL). A atividade dessa enzima é aumentada por fatores ambientais: níveis de nutrientes, luz e infecções por fungos. É uma enzima chave na indução de resistência, por estar diretamente envolvida no metabolismo de fenilpropanóides (unidades básicas de formação de compostos fenólicos mais complexos como lignina, flavonóides, taninos entre outros). É reponsável pela desaminação de L-fenilalanina em ácido cinâmico, origem de uma série de compostos de importância na indução de resistência (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Estudos realizados por Guimarães et al. (2007), avaliando preparados de cravo-da-índia, observaram que esses preparados apresentaram capacidade de indução na síntese de fitoalexinas, gliceolinas, em cotilédones de soja, sendo o óleo essencial o detentor de maior efeito na indução.

### 3.3. CARACTERÍSTICAS DA CAVALINHA (*Equisetum* sp) NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.

A *Equisetum* sp, conhecida como cavalinha, rabo-de-cavalo, erva-canudo, lixa-vegetal, entre outros. Pertence a família das *Equisetaceae*, nativa do Continente

Americano e distribuída por todo território brasileiro principalmente na região sul (LORENZI, 2000; SANTOS, BRUSCATTO e HECK, 2009), podendo atingir 130 cm de altura (LORENZI, 2000).

É considerada uma planta daninha tóxica para eqüinos, bovinos e animais domésticos. Porém, apresenta em sua constituição fitoquímica: ácido sílico, ácido gálico, resinas, sais de potássio, tiaminas, luteolina, saponinas, compostos inorgânicos (Ca, Mg, Na, F, Mn, Si, S, P, Cl e K), triglicerídios, óleos, flavonóides (isoquercetina, equisetrina, canferol, galutenina, fitosterol), triglicerídeos (ácido oléico, esteárico, lenoléico e linolênico), alcalóides (metosapiridina, nicotina, palustrina, palustrinina), vitamina C e taninos (BERTALOT et al., 2010b).

Seu uso medicinal se dá para o tratamento de doenças reumáticas, cálculos renais e demais infecções do trato urinário. Possuindo também ação diurética, anti-hemorrágica e anti-anêmica (SANTOS, BRUSCATTO e HECK, 2009), seu chá é muito utilizado no aumento da resistência de plantas a insetos (BERTALOT et al., 2010b). Porém suas propriedades medicinais ainda necessitam de estudos mais aprofundados.

Seu alto teor de silício confere-lhe ação fitoprotetora, e quando aplicado diretamente sobre as plantas, o chá de cavalinha pode agir durante todo período produtivo da cultura, inclusive no pós-colheita, demonstrando-se muito eficaz no controle do desenvolvimento de fungos e evitando sua proliferação em substratos de mudas para horticultura (BERTALOT et al., 2010b).

Estudos vêm sendo realizados utilizando extratos de cavalinha no controle de doenças, como o de Bertalot et al. (2010), no controle alternativo de doenças do morangueiro, ao utilizar decocção de *Equisetum giganteum* observaram que o extrato atuou no controle de manchas foliares decorrentes de *Mycosphaerella fragariae*. Camatti-Sartori et al. (2011), verificando a atividade de extratos vegetais sobre fungos de flores, observou que extratos acéticos a 25 e 50% e etanólicos a 50% de *Equisetum arvense* inibiram o desenvolvimento micelial de *Botrytis sp.* em mais de 50%. Paixão et al. (2011), ao testar tinturas de plantas no controle de crestamento bacteriano comum em feijão de vagem, observou que as tinturas de *Equisetum sp.*, diluídas em água e aplicadas nas plântulas, não apresentaram atividade no controle da doença.

Rozwalka et al. (2008) avaliando extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum*

*gloeosporioides*, verificaram que a cavalinha (*Equisetum* sp.) não apresentou atividade no controle de *C. gloeosporioides*.

Estudo pioneiro, desenvolvido por Padilha et al. (2007), relatou o potencial da cavalinha no processo de indução de resistência em plantas. Os autores avaliaram diferentes extratos da planta na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja e observaram a ativação das mesmas pela utilização de macerados e extrato alcoólico quando comparados a decocção e infusão.

### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DA *Rhizoctonia* sp.

O gênero *Rhizoctonia* compreende fungos presentes no solo e que produzem escleródios indiferenciados, desencadeando doença em uma ampla gama de espécies agrícolas. Para identificação do mesmo são utilizados como parâmetros: o número de núcleos presentes nas células e a fusão de suas hifas, sendo esta última dividida em três grupos: uni, bi e multinucleadas; ou ainda em grupos de anastomose (de acordo com a fusão de suas hifas). (SILVEIRA e ALFENAS, 2002; SANFUENTES et al., 2007)

É crescente a importância de isolados de *Rhizoctonia* sp, dentre as culturas mais prejudicadas pelo fungo podemos citar as florestais e olerícola, devido a incidência de mela ou podridão de estacas, tombamento de plântulas ou queima de brotações e folhas, culminando com a morte das plantas (SILVEIRA et al., 2000; SILVEIRA e ALFENAS, 2002; ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2004; SANFUENTES et al., 2007; MAZARO et al., 2009). Esse gênero não ataca apenas plantas no campo, pode também estar presente em estufas, causando doenças em plantas recém transplantadas, principalmente em solos úmidos (ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2004).

Em geral as medidas tomadas como a eliminação de plantas mortas infectadas, folhas e ramos doentes, visam a prevenção da doença, diminuindo a quantidade de inoculo, mas não eliminam o patógeno no solo ou substrato (KUNIEDA-ALONSO, ALFENAS e MAFFIA, 2005). As tentativas de controle ocorrem fazendo a utilização de fungicidas como benzimidazóis, carboximidas, triazóis, morfolinas entre outros, que além de ser de alto custo e perigosos, nem sempre são eficazes no controle dos patógenos, evidenciando assim a necessidade de estudos

mais aprofundados quanto a novas alternativas de controle (SILVEIRA et al., 2003; ABBASI, CONN e LAZAROVITS, 2004).

Mazzini e Faria (2002) em estudo sobre o controle de plantas daninhas, insetos e fungos em culturas olerícolas utilizando extratos vegetais, observaram que houve inibição do crescimento de *Rhizoctonia* sp. CUNICO et al., (2007) testando a atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana*, também conseguiram obter inibição do crescimento desse fungo. MIETH et al., (2007), avaliando a influencia de extratos vegetais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de *Luehea divaricata*, observaram que o uso de extrato de fumo favoreceu a incidência de *Rhizoctonia* sp, enquanto que os extratos de pitanga e cinamomo inibiram seu surgimento.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos (PR), nos meses de Fevereiro a Junho do ano de 2011.

As amostras de material vegetal foram coletas na horta medicinal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos (PR), nos meses de Fevereiro a Junho do ano de 2011, ao entardecer. Foram utilizados os caules da planta fresca, logo após sua coleta, para a elaboração dos extratos. Esses foram extraídos por meio de infusão, maceração e extrato alcoólico; para ambos a solução mãe foi preparada na concentração de 40% e as demais concentrações (1, 10 e 20%) foram diluídas a partir dessa. A infusão foi preparada utilizando 1000 ml de água destilada fervente adicionando em seguida 400 gramas de *Equisetum* sp., permanecendo em repouso por 20 minutos em recipiente fechado, após esse repouso a solução foi filtrada e conservada sob refrigeração e ao abrigo da luz até sua utilização. Para a maceração foram levados ao liquidificador 400 gramas da planta e 1000 mL de água fria destilada; após a trituração, a solução permaneceu em repouso por 8 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz, após procedeu-se com a filtragem e conservação sob refrigeração e ao abrigo da luz até sua utilização. Para preparo do extrato alcoólico, 400 gramas da planta foram adicionados de 1000 mL de álcool etílico absoluto, a solução foi deixada em repouso por 48 horas, evaporada em evaporador rotativo e ressuspensa em água, após procedeu-se com a conservação sob refrigeração e ao abrigo da luz até sua utilização.

As metodologias utilizadas encontram-se descritas a abaixo:

##### 4.1 INDUÇÃO DE FITOALEXINAS E QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA EM COTILÉDONES DE SOJA EM RESPOSTA A EXTRATOS DE *Equisetum* sp.

As sementes de soja foram semeadas em gerbox contendo areia autoclavada e mantidas em laboratório a temperatura de 25°C. Após 10 dias os cotilédones das plântulas foram removidos, lavados com água destilada e pesados. Na fase abaxial dos cotilédones foi feito um corte superficial e, sobre esse corte, depositado 40uL da preparação elicitora ou de água destilada quando testemunha

(Fig. 1). Os cotilédones foram arranjados em placas de petri (quatro por placa) forradas com disco de papel de filtro umedecidos com água destilada. As placas tampadas e não vedadas, foram mantidas em câmara de crescimento (BOD.), a 26°C, no escuro. Após 20 horas, os cotilédones foram retirados das placas e colocados em tubos plásticos contendo 15mL de água destilada, e então estes tubos foram submetidos a agitação mecânica por 1 hora para a extração de gliceolina. A solução foi filtrada e a absorbância determinada em 285nm. Os cotilédones foram então congelados e utilizados para as análises de compostos fenólicos, FAL e proteínas.



**Figura 1 - Aplicação de tratamentos em cotilédones de soja, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011**

Para análise do teor de fenóis totais foi utilizada uma metodologia adaptada do descrito por Bieleski e Turner (1966) e Jennings (1981), onde o sobrenadante oriundo da trituração de parte do cotilédone com solução de MCA (metanol, clorofórmio, água), foi adicionado de 0,5 mL de água e 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteau (diluído 1:10) e 5 mL do reagente alcalino A; após cinquenta minutos, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro a 760 nm. O resultado foi expresso em massa de matéria fresca.

Para dosagem de proteínas totais, foi empregado o teste de Bradford (1976), o cotilédone foi triturado em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (12.000g / 10 min a 4°C) e o sobrenadante

coletado. Ao sobrenadante foram adicionados 460µl de água e 1 ml de reagente de Bio-rad. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 630 nm, com curva de soro albumina bovina como padrão.

Para quantificação da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), parte do cotilédone foi triturado em almofariz previamente gelado, acrescentando-se 6,0 mL do tampão de extração, a 4°C, e macerando-se a mistura completamente, a qual foi centrifugada em seguida a 6000 g por 10 min a 4°C. Foram utilizados, 1,5 mL de cada extrato enzimático (sobrenadante), acrescentado de 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg mL<sup>-1</sup>) ou água destilada na prova em “branco”. A mistura foi incubada a 40°C por uma hora, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras espectrofotométricas a 290 nm (RODRIGUES et al., 2006). A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (Hyodo et al., 1978).

#### 4.2 EFEITO FUNGISTÁTICO *IN VITRO* DE PREPARADOS DE *Equisetum* sp.

Ao meio BDA (batata-dextrose-ágar), ainda não solidificado, foi adicionado, o extrato vegetal (obtido anteriormente) em placas de Petri® (8 mL placa<sup>-1</sup>). Após solidificação do meio foi transferido para o centro de cada placa, um disco de 8 mm de diâmetro, colonizado com o micélio do *Rhizoctonia solani* (Fig. 2).(Casarin et al., 2007). Posteriormente, as placas foram incubadas sob alternância de fotoperíodo de 12 horas, em temperatura de 25°C ± 2°C. As testemunhas consistiram de discos de micélio do meio BDA com ausência do extrato vegetal.



Figura 2 - Inserção dos discos de micélio com *Rhizoctonia solani* sobre os meios de cultura após solidificação, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada a partir de 48 horas de incubação, para isso foram realizadas medições diárias da velocidade de crescimento linear do micélio utilizando-se paquímetro. Cada observação dessa variável foi oriunda da média entre duas medidas opostas (sentido cruzado) do diâmetro da colônia até a testemunha atingir a borda (Fig.3).



Figura 3 - Placas (testemunha) onde o fungo *Rhizoctonia solani* cresceu até a borda da placa, Laboratório de Fitossanidade, Dois Vizinhos, 2011.

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado para os experimentos foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x5 resultante da combinação de três formas de extração (extrato alcoólico, infusão e maceração) e cinco concentrações (zero; 1; 10, 20 e 40%), com quatro repetições.

Os dados das variáveis analisadas nos dois experimentos foram submetidos à análise estatística, com auxílio do software ASSISTAT 7.6 BETA. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade de erro.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os preparados da cavalinha apresentaram estatisticamente ação significativa na indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, uma vez que ocorreu interação significativa entre as variáveis concentrações e os preparados (Tabela 1), com destaque para os preparados obtidos através de extração alcoólica, que apresentou superioridade em todas as concentrações, exceto nas de 1% e 40% que não diferiram da maceração. O extrato a base de infusão obteve menor capacidade de indução de fitoalexinas comparado com os demais, possivelmente, o processo de extração com água quente desestruturou algumas moléculas, que com a maceração e o extrato alcoólico se mantiveram ativas.

Quanto as concentrações por cada forma de obtenção dos preparados o extrato alcóolico juntamente com a maceração tiveram a maior resposta de indução das fitoalexinas gliceolinas nas concentrações de 40%. Já para os preparados a base de infusão, ocorreu resposta na indução de fitoalexinas em concentrações igual ou maiores que 1%, no entanto, a resposta obtida pela infusão foi inferior estatisticamente as demais formas de extração dos preparados nestas mesmas concentrações.

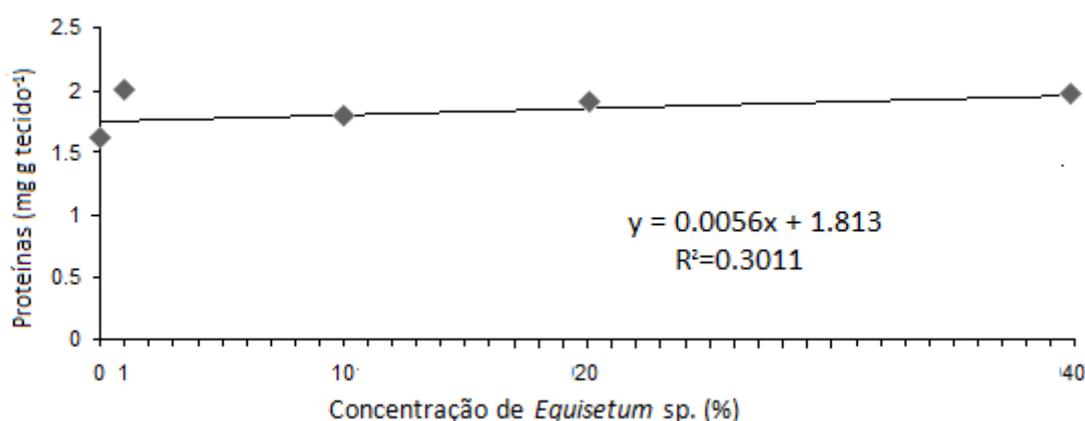
Resultados semelhantes foram encontrados por Gouvea et al (2011) estudando extratos vegetais na indução de fitoalexinas de soja, onde verificaram que os extratos de alho e de neem induziram a produção de fitoalexinas gliceolinas em soja. Luckmann et al (2007) ao avaliar extratos de Alecrim (*Rosmarinum officinalis* L.), observaram que o extrato alcoólico de folhas e o óleo essencial da planta possuem ação na indução de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja. Guimarães et al (2007) testando diferentes preparados de Cravo-da-índia, verificaram que os preparados de cravo-da-índia apresentaram capacidade de indução das fitoalexinas em cotilédones de soja, o efeito foi mais pronunciado para extrato alcoólico e decocção nas concentrações acima de 10% e infusão e maceração na concentração de 40%. Padilha et al (2007b) em estudos realizados para verificar a indução de resistência em resposta aos extratos de folhas de alfavaca-cravo, observaram que os macerados e o óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) possuem ação na indução de fitoalexinas gliceolinas em soja.

**Tabela 1:** Absorbância de fitoalexina gliceolina (por grama de peso fresco) em cotilédones de soja pelos diferentes preparados e concentrações de *Equisetum sp.* UTFPR, Dois Vizinhos, 2012.

Forma de Extração	Concentração (%)				
	0	1	10	20	40
Extrato alcoólico	0,067 a E	0,18 a D	0,3 a C	0,4 a B	0,51 a A
Maceração	0,067 a D	0,17 ab C	0,18 b C	0,29 b B	0,45 a A
Infusão	0,067 a B	0,13 b A	0,14 b A	0,15 c A	0,16 b A
<b>CV (%)</b>	<b>8,43</b>				

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados observados demonstraram que quanto ao teor de proteínas, não ocorreu interação entre os preparados x concentrações. Apenas, apresentou resposta significativa para o fator concentrações, demonstrando comportamento linear crescente com o aumento das concentrações dos preparados, conforme pode ser observado na Figura 4. Bem como os preparados não tiveram ação direta sobre a enzima FAL, não ocorrendo efeito significativo entre os diferentes preparados e as concentrações testadas.



**Figura 4:** Teor de proteínas em cotilédones de soja em função das diferentes concentrações dos preparados de *Equisetum sp.*, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. \*\*Significativo a 5% de probabilidade.

A atividade da FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido

transcinâmico, catalizada pela FAL, resultando em compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos.(RODRIGUES, NETO E COELHO, 2006; MAZARO et al, 2009). Silva, Pascholati e Bedendo (2008), estudando a indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*, evidenciaram que as análises bioquímicas de quitinase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase não são bons marcadores de resistência para o patossistema em questão, visto que os tratamentos realizados no experimento, não mostraram diferenças significativas em relação ao tratamento água.

Segundo Rodrigues, Neto e Coelho (2006), existe a possibilidade de que a síntese de FAL ocorra tardiamente, pois, a ativação da FAL não depende somente dos extratos indutores, mas também podem estar relacionados a outros fatores, como ferimento ou luz, o pico da atividade enzimática deve ocorrer entre 24 a 48 h no após a indução, porém, ainda segundo Rodrigues, Neto e Coelho (2006), alguns trabalhos com indutores bióticos e abióticos em bananeira e feijoeiro têm evidenciado atividade tardia da PAL, aos seis, oito e 12 dias após a indução.

Os preparados da cavalinha apresentaram ação significativa na indução dos fenóis totais em cotilédones de soja, ocorrendo interação significativa entre os preparados x concentrações (Tabela 2). Em relação ao extrato alcóolico e maceração as maiores respostas foram obtidas nas concentrações de 20% e 40%. Já para os preparados a base de infusão, a superioridade estatística para indução de compostos fenólicos foi alcançada nas concentrações de 1% e 40% do preparado. Observa-se que quanto a forma de obtenção dos preparados, assemelha-se estatisticamente nas concentrações de 1 e 10%. Por outro lado, o extrato alcóolico juntamente com a maceração foram superiores a infusão nas concentrações de 20 e 40%.

Os compostos fenólicos, são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes, são tóxicos aos patógenos. Os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico são exemplos de alguns desses compostos. Algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos (BARROS et al, 2010). Segundo Bertalot et al, (2010b) a *Equisetum* sp. é uma planta com alto teor de silício, o silício, segundo Barros et al (2010), desencadeia um maior acúmulo de

compostos fenólicos e lignina no local da injúria, e, danos a estrutura física do patógeno, pode ainda causar espessamento da parede celular devido a deposição de sílica e aumentar a capacidade fotossintética.

Tabela 2: Teor de fenóis totais em cotilédones de soja pelo tratamento com cinco diferentes concentrações de extratos alcoólico, macerado e infuso de *Equisetum sp.*, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

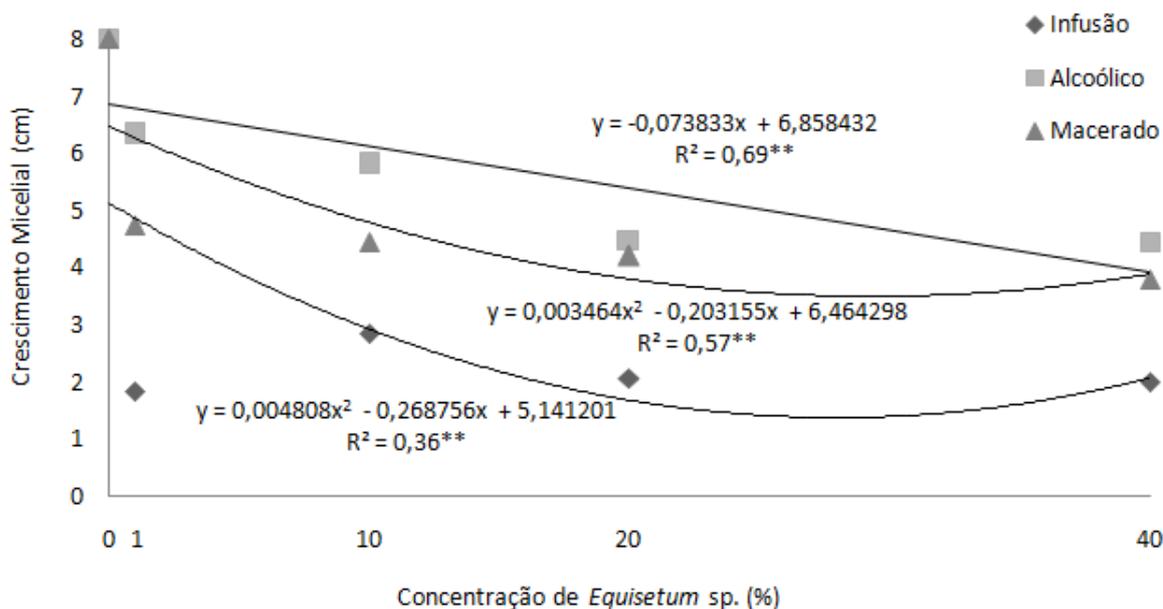
Forma de Extração	Concentração (%)				
	0	1	10	20	40
Extrato alcoólico	1,14 a C	1,63 a B	1,82 a B	1,95 a AB	2,29 a A
Maceração	1,14 a D	1,77 a BC	1,71 a C	2,15 a AB	2,52 a A
Infusão	1,14a B	1,62 a A	1,57 a A	1,49 b AB	1,23 b AB
<b>CV (%)</b>	11,96				

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 5 observou-se o efeito dos preparados a base de *Equisetum sp.* no crescimento de *Rhizoctonia solani*, 14 dias após a incubação, período o qual, o fungo nas placas testemunhas (0% de *Equisetum sp.*) atingiu as bordas das placas de Petri®.

Os resultados demonstraram influência significativa dos preparados de cavalinha sobre a redução do crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*. No extrato alcoólico a equação obtida foi linear decrescente com o aumento das concentrações do extrato de *Equisetum sp.*, sendo que neste ocorreu maior supressão do crescimento micelial em comparação as demais formas de obtenção dos preparados. Para infusão e maceração a equação que melhor se ajustou foi a quadrática, sendo que os pontos de maior inibição do crescimento micelial para os extratos infusão e maceração foram nas concentrações de 27,95% e 29,32% respectivamente.

Tais resultados também corroboram com os observados na indução de fitoalexinas e compostos fenólicos. Quanto ao efeito das concentrações, observou-se que com o aumento das concentrações ocorreu maior efeito sobre a supressão do crescimento do fungo.



**Figura 5:** Efeito fungistático *in vitro* sobre *R. solani*, com a aplicação de cinco concentrações de extratos infuso, alcoólico e macerado de *Equisetum* sp., 14 dias após a incubação, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

Em estudos semelhantes aos realizados, Cunico et al (2004), avaliou o efeito antifúngico de extratos alcoólicos e aquosos de folhas, caules e raízes de *Ottonia martiana* sobre três fitopatógenos (*Fusarium*, *Colletotrichum* e *Rhizoctonia*), observaram que o extrato aquoso de folhas frescas apresentou maior inibição sobre *Rhizoctonia* sp, enquanto que o extrato etanólico inibiu o crescimento dos três fungos em mais de 50%. Amaral e Bara (2005), avaliando a atividade antifúngica de extratos de açafraão, coração de negro e óleo essencial de cravo da Índia, sobre os fitopatógenos: *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia* e *Sclerotium*, observaram que o extrato bruto de açafraão inibiu em mais de 50% o crescimento de *R. solani*. Mieth et al (2007), avaliando a influência de extratos vegetais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de *Luehea divaricata*, observou que o uso de extratos de fumo (*Nicotiana tabacum*) favoreceu a incidência de *Rhizoctonia* sp, enquanto que os extratos de Pitanga (*Eugenia uniflora*) e Cinamomo (*Melia azedarach* L) inibiram seu surgimento.

## 6. CONCLUSÃO

Os preparados de extrato alcoólico, infusão e maceração de cavalinha apresentam capacidade de indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, bem como, ativam o metabolismo de compostos fenólicos. Entre os preparados, o extrato alcoólico e a maceração, se sobressaem sobre a infusão.

Os preparados de extrato alcoólico, infusão e maceração de cavalinha em todas as suas concentrações inibem o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*, *in vitro*, sendo que o extrato alcoólico apresenta maior capacidade de supressão do crescimento micelial em comparação as demais formas de obtenção dos preparados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI P.A., CONN K.L., LAZAROVITS G., Suppression of Rhizoctonia and Pythium dampingoff of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or soil, **Plant Pathol.** 26: 177–187 2004;

AMARAL M.F.Z.J., BARA M.T.F.; Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos, **Revista Eletrônica de Farmácia**, Suplemento Vol 2 (2), 5- 8, 2005;

BARROS F.C., SAGATA E., FERREIRA L.C.C., JULIATTI F.C., Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos, **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010;

BERTALOT M.J.A., CARVALHO-PUPATTO J.G., RODRIGUES E.M., MENDES R.D., BUSO D., **Controle alternativo de doenças do morangueiro**, 2010a;

BERTALOT M.J.A., CARVALHO-PUPATTO J.G., FURTADO E.L., ROSA D.D., MENDONZA E., LIMA A.B., Métodos alternativos para controle de doenças fúngicas na cultura de jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) através de *Equisetum spp* e preparado biodinâmico 501, **Rev. Bras. de Agroecologia.** 5(2): 264-274 2010b;

BETTIOL, W. ; GHINI, R.; MORANDI, M.A.B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças.** 1 ed. Viçosa: EPAMIG, 2006;

BIELESKI, R.L; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.17, p.278-293, 1966;

BONALDO, S. M. ; SCHWAN-ESTRADA K.R.F. ; STANGARLIN J.R. ; TESSMANN D.J. ; SCAPIM C.A ; Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 29, n. 2, Apr. 2004;

BONALDO S.M.; SCHWAN-ESTRADA K.R.F; STANGARLIN J.R.; CRUZ M.E.S.; FIORI-TUTIDA A.C.; Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007;

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976;

BRAGA, M.R. **Fitoalexinas e a defesa das plantas.** Acesso em 22/jul/2007;

BRAND, S.C.; JUNGES, E.; MILANESI, P.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B., Extratos vegetais no controle de patógenos em sementes de cebola, **UFPEL**, 2006;

BRAND S.C., MANZONI C.G., JUNGES E., DURIGON M.R., MILANESI P., BLUME E., MUNIZ M.F.B., Extrato de *Maytenus ilicifolia* não inibe *Trichoderma* sp., **Rev Bras. de Agroecologia**, 2007;

BRAND, S.C.; BLUME, E.; SCHERREN, M.B.; MILANESI, P.; MÜLLER, J.; ANTONELLO, L.M.; MELLO, P.A.; Extrato de alho no crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e na indução de faseolina em *Phaseolus vulgaris*; **Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica**, UFPEL, 2008;

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F.E.; CRIPPA, L.B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores, **Rev. Bras. de Agroecologia**. 6(2) : 117-122, 2011;

CAVALCANTI, L.S; BRUNELLI, K. R.; STARGARLIN, J.R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ, p.81-124. 2005.

CARVALHO R.A.; LACERDA J.T.; OLIVEIRA E.F.; SANTOS E.S.; Extratos de Plantas Medicinais como Estratégia para o Controle de Doenças Fúngicas do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste; **II Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do taro**, 2, 2002;

CARVALHO V.L., CUNHA R.L., CHALFUN N.N.J., MOURA P.H., Alternativas de controle pós-colheita da podridão parda e da podridão mole em frutos de pessegueiro, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v 31 n1, Jaboticabal – SP, 2009, p 78-83;

CASARIN J.V., COILA V.H.C., ROSSETO E.A., Avaliação da sensibilidade a fungicidas através do crescimento micelial *in vitro* de *Monilinia fruticola*, XVI Congresso de Iniciação Científica, IX Encontro de Pós Graduação, **UFPEL**, 2007;

CELOTO M.I.B., PAPA M.F.S., SACRAMENTO L.V.S., CELOTO F.J., Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*, **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008;

CUNICO M.M., CARVALHO J.L.S, SILVA V.C., MONTRUCCHIO D.P., KERBER V.A., GRIGOLETTI JÚNIOR A., AUER C.G, MIGUEL M.D., MIGUEL O.G; Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* miq. (piperaceae) sobre três fitopatógenos, **Arq.Inst.Biol.**, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004;

FERNANDES M.B., RODRIGUES M.L.M., FAGUNDES I.R.F., LOPES R.S., SOARES B.P.S., MIZOBUTSI E.H., MARTINS I.P.S; Ação dos extratos de eucalipto sobre a esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*, Anais on line do **V Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão**, 2011;

GONÇALVES G.G., MATTOS L.P.V., MORAIS L.A.S. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle de fitopatógenos de grãos de soja. **Horticultura Brasileira** 27: S102-S107, 2009;

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S.M.; POSSENTI, J.C.; Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo; **Rev. Bras. de Agroecologia**. 6(2) : 70-78 2011;

GUIMARÃES S.S.; MAZARO S.M., RAMOS C.E.P., GOUVEA A., SZEPAHUK V , PADILHA T.R.; Indução de Fitoalexinas em cotilédones de Soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de capítulos florais de Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), **Anais do I Seminário de Sistema de Produção Agropecuária da UTFPR**, Dois Vizinhos – PR, 2007, p:18-21;

ITAKO A.T., SCHWAN-ESTRADA K.R.F., TOLENTINO JÚNIOR J.B., STANGARLIN J.R., SILVA CRUZ M.E.; Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais; **Tropical Plant Pathology**, vol. 33, 3, 241-244, 2008;

JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.118, p.396-398, 1981;

KUNIEDA-ALONSO S., ALFENAS A.C., MAFFIA L.A.; Sobrevivência de Micélio e Escleródios de *Rhizoctonia solani* Tratados com *Trichoderma* spp., em Restos de Cultura de *Eucalyptus* sp.; **Fitopatol. bras.** 30(2), mar - abr 2005;

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000;

LORENZI H., ABREU MATOS F.J., **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**; Instituto Plantarum, 2ª Ed., Nova Odessa, São Paulo – SP, 2005;

LUCKMANN D., MAZARO S.M., GOUVEA A., PADILHA T.R., GUIMARÃES S.S., SZEPAHUK V.; Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.); **Anais do I Seminário Sistemas de Produção Agropecuária** – 2007;

MAZARO, S.M.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; GOUVEA, A.; POSSENTI, J. C. . Indução de Resistência em Plantas. In: Thomas Newton Martin & Marcelo Marcos Montagner. (Org.). **Sistema de Produção Agropecuária**. -1 ed. UTFPR - Dois Vizinhos: MasterGraf Gráfica e Editora, 2007, v. 1, p. 183-195.

MAZARO S.M., WAGNER JÚNIOR A., SANTOS I., CITADIN I., POSSENTI J. C., GOUVÊA A.; Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana; **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.11, p.1424-1430, nov. 2009;

MAZZINI L.M., FARIA T.J. ; *Estudo de controle de plantas daninhas, insetos e fungos em culturas olerícolas utilizando extratos vegetais*, **XI Encontro Anual de Iniciação Científica – UEL**, 2002 ;

MIETH, A.T.; PIVETA, G.; PACHECO, C.; HAMANN, F.A.; RODRIGUES, J.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E.; Influência de extrato vegetal na qualidade sanitária e fisiológica

em sementes de *Luehea divaricata* (Açoita-cavalo); **Rev. Bras. de Agroecologia**, 2007 Vol.2 No.2;

MOREIRA C.G.A.; SCHWAN-ESTRADA K.R.F.; BONALDO S.M.; STANGARLIN J.R.; CRUZ M.E.S.; Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*, **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 332-337, 2008;

MONTOYAMA M.N., SCHWAN-ESTRADA K.R.F., STAGARIN J.R., FLORI-TUTIDA A.C.G., SCAPIM C.A., Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*, **Acta Scientiarum Agronomy**, v 25 n 2, Maringá – PR, 2003, p491-496;

OLIVEIRA F., AKISUE G., **Fundamentos da Farmacobotânica**, Ed. Atheneu, 2ª Ed., São Paulo – SP, 2005, pg 157-163;

PADILHA T.R., MAZARO S.M., RAMOS C.E.P., GOUVEA A., GUIMARÃES S.S., LUCKMANN D., Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de cavalinha (*Equisetum giganteum*), **Anais do I Seminário de Sistema de Produção Agropecuária da UTFPR**, Dois Vizinhos – PR, 2007, p:30-33;

PAIXÃO G.L.S.; SEABRA J.R.S.; MORAIS L.A.S.; BIAZON V.L.; GOTO R.; MARINGONI A.C.; MING L.C.; Atividade de tinturas de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum em feijão vagem; **Rev. Bras. Horticultura**, 2011;

PAULA JÚNIOR T.J., MORANDI M.A.B., ZAMBOLIM L., SILVA M.B., Controle Alternativo de doenças de plantas – Histórico; In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. 1 ed. Viçosa: EPAMIG, 2006;

RAVEN P.H., **Biologia Vegetal**, Editora Guanabara Koogan S.A, 6ª Edição, Rio de Janeiro – RJ, 2001;

RIBEIRO L.F.; BEDENDO I.P.; Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro; **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1267-1271, out./dez. 1999;

RODRIGUES A.A.C, NETO E.B., COELHO R.S.B., Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada, **Fitopatol. Bras.** 31(5), set - out 2006;

ROMEIRO, R.S.; **Controle biológico de doenças de plantas**, Ed. UFV, 2007;

ROSAL, L.F.; LEITE, C.D.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R.; Eficiência do uso de extrato aquoso de Sálvia em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Penicillium* sp., **Rev. Bras. de Agroecologia**/nov. 2009;

ROZWALKA L.C.; LIMA M.L.R.Z.C.; MAY DE MIO L.L.; NAKASHIMA T.; Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutas de goiaba; **Rev Ciência Rural**, 2008;

SANFUENTES E., ALFENAS A.C., MAFFIA L.A., MAFIA R.G., Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. e identificação de novos grupos de anastomose em Jardim Clonal de Eucalipto, **Rev. Fitopatol. Bras.** 32(3), maio - jun 2007;

SANTOS M.C., BRUSCATTO M.H.,HECK R.M., Reflexões fitoterápicas sobre a cavalinha (*Equisetum* sp. l.) com base na antroposofia, XVII Congresso de Iniciação de Científica, **UFPEL**, 2009;

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN J.R.; CRUZ M.E.S.; Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Rev. Floresta**, v.30, n. 1-2, p. 129-137, 2000;

SILVA D.M.M.H., BASTOS C.N., Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de Piper sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, **Fitopatol. Bras.** 32(2), mar - abr 2007;

SILVA J.A; PEGADO C.M.A.; RIBEIRO V.V.; BRITO N.M.; NASCIMENTO L.C.; Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum* em sementes de caupi; **Ciênc. Agrotec.** vol.33 no.2 Lavras Mar./Apr. 2009;

SILVA M.B.; ROSA M.B.; BRASILEIRO B.G.; SILVA C.A.; Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas, In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. 1 ed. Viçosa: EPAMIG, 2006;

SILVA R.A.; REIS V.M.; BALDANI J.I.; OLIVARES F.L; **Defesa de Plantas contra o ataque de fitopatógenos**, Documentos da Embrapa, Serópedica – RJ, 2008;

SILVA R.F., PASCHOLATI S.F., BEDENDO I.P., Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*, **Summa phytopathol.** vol.34 no.2, 2008;

SILVEIRA S.F., ALFENAS A.C., Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp. patogênicos a Eucalyptus, **Rev. Fitopatol. bras.** 27(1), jan - fev 2002;

SILVEIRA S.F, ALFENAS A.C., FERREIRA F.A., SUTTON J.C., Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated Eucalyptus in Brazil, **European Journal of Plant Pathology** 106: 27–36, 2000;

SILVEIRA S.F., ALFENAS A.C., MAFFIA L.A., SUZUKI M.S.; Controle Químico da Queima de Folhas e da Mela de Estacas de Eucalipto, Causadas por *Rhizoctonia* spp.; **Fitopatol. bras.** 2003;

SOUZA A.E.F.; ARAÚJO E.; NASCIMENTO L.C.; Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho, **Fitopatol. bras.** vol.32 no.6 Brasília Nov./Dec. 2007;

SOUZA, L.; SOARES, A.C.F.; Efeito *in vitro* Do Extrato Aquoso De Nim (*Azadirachta indica*) E Alho (*Allium sativum* L.) Em *Aspergillus niger*, **Rev. Bras. de Agroecologia**/nov. 2009;

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004;

VENTUROSO, L.R.; BACCHI L.M.A; GAVASSONI W.L.; CONUS L.A.; PONTIM B.C.A.; BERGAMIN A.C.; Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa phytopathol.**, vol.37, n.1 2011;

VIGO-SCHULTZ S.C.; STANGARLIN J.R.; FRANZENER G.; PORTZ F.L.; KUHN O.J.; SCHWAN-ESTRADA K.R.F.; 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**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, out./dez. 2006;