

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

LINDOMAR ASSI

EXTRATO FORMULADO DE *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Pycnoporus sanguineus* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2012

LINDOMAR ASSI

EXTRATO FORMULADO DE *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Pycnopus sanguineus* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

Tese apresentada a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Doutorado, para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RENATO STANGARLIN
COORIENTADOR: PROF. DR. AFFONSO CELSO GONÇALVES JUNIOR

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço a minha família, meus pais Evilasio Assi e Leocadia Assi, meus filhos Eduarda Caroline Assi e Vitor Mateus Ludvichak Assi, a minha irmã, seu esposo e afilhada Lijandri, Enomar e Leticia Heck pelo apoio incentivo.

Ao meu irmão em Cristo e orientador Professor Dr. José Renato Stangarlin, pelos ensinamentos durante a minha trajetória acadêmica, profissional e espiritual, pela oportunidade, paciência e ajuda em todos os momentos, descrevo meu carinho e minha admiração.

Ao amigo e professor Dr. Affonso Celso Gonçalves Junior pela coorientação neste trabalho.

Aos eternos amigos Cristiane Cláudia Meinerz, Gilmar Franzener, Roberto Luiz Portz e Rubens Fey os quais estiveram constantemente presentes, colaborando diretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Odair Kuhn pela ajuda e disponibilidade no desenvolvimento de diversas metodologias.

Aos colegas de pós-graduação que estiveram presentes no desenvolvimento deste trabalho e me apoiaram para a realização do mesmo.

A todos os professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

À EMBRAPA CNPH pelo acordo de transferência de material da sua unidade.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desta obra.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 CULTURA DO TOMATE NO BRASIL.....	2
2.2 MANCHA BACTERIANA - <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	3
2.3 PINTA PRETA – <i>Alternaria solani</i>	5
2.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	6
2.4.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	6
2.5 EXTRATOS DE PLANTAS.....	7
2.5.1 Alecrim e seu uso para o controle de fitopatógenos.....	10
2.5.2 A cúrcuma e seu uso para o controle de fitopatógenos.....	10
2.6 EXTRATOS DE FUNGOS.....	11
2.6.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	12
3. REFERÊNCIAS.....	14
 CAPÍTULO I - EXTRATO FORMULADO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> PARA CONTROLE DE <i>Alternaria solani</i> E DE <i>Xanthomonas vesicatoria</i> EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO....	23
1. RESUMO.....	23
2. ABSTRACT.....	23
3. INTRODUÇÃO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS.....	26
4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO.....	26
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	26
4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO.....	27
4.4.1. Avaliação da concentração do formulado.....	27
4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	28
5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.....	30
5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração.....	30
5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

CAPÍTULO II - EXTRATO FORMULADO DE *Curcuma longa* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO.....

1. RESUMO.....	38
2. ABSTRACT.....	38
3. INTRODUÇÃO.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS.....	41
4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO.....	41
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	41
4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO.....	42
4.4.1. Avaliação da concentração do formulado.....	42
4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.....	46
5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração.....	46
5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

CAPÍTULO III - EXTRATO FORMULADO DE *Pycnoporus sanguineus* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO....

1. RESUMO.....	54
2. ABSTRACT.....	54

3. INTRODUÇÃO.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS.....	57
4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO.....	57
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO.....	59
4.4.1. Avaliação da concentração do formulado.....	59
4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	59
5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO.....	61
5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração.....	61
5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.....31

Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicleto de cobre (400 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.....32

Capítulo II

Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.....46

Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicleto de cobre (400 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.....47

Capítulo III

Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de *P. sanguineus*, obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.....62

Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L^{-1}) de extrato aquoso de *P. sanguineus*, obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicleto de cobre (400 mg L^{-1}). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett $\leq 5\%$) em relação ao tratamento fungicida.....63

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....29

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....30

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.....32

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.....33

Capítulo II

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....44

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....45

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.....48

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.....48

Capítulo III

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. sanguineus* obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....60

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. sanguineus* obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.....61

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de *P. sanguineus* na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.....63

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de *P. sanguineus* na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.....64

RESUMO

EXTRATO FORMULADO DE *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* e *Pycnopus sanguineus* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

Face aos problemas de contaminação ambiental e danos em organismos não alvos resultantes do uso indiscriminado de agrotóxicos, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria* e o controle da pinta preta e da mancha bacteriana no tomateiro, utilizando para tanto, produto formulado estável, na forma de pó solúvel, de folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa*) e basidiocarpo de *Pycnopus sanguineus*. Para o teste de estabilidade, o pó solúvel foi armazenado a 40 °C por 0, 60, 120 e 180 dias e testado em cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Definidos o tempo de prateleira e a melhor concentração, avaliaram-se os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. Não houve *in vitro* atividade antifúngica e antibacteriana de todos os extratos. A concentração calculada de extrato de *P. sanguineus* que resultou em menor severidade das doenças foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹, com tempo de prateleira do pó solúvel de 24 meses. *In vivo*, os extratos proporcionaram o mesmo nível de controle da pinta preta e da mancha bacteriana que os fungicidas utilizados, com eficiência de até 75% para alecrim e cúrcuma e 79%, para *P. sanguineus*, todos em intervalo de aplicação de sete dias. Estes resultados demonstram a eficiência do controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro, provavelmente por indução de resistência, pelo extrato aquoso obtido de formulação pó solúvel de *R. officinalis*, *C. longa* e *P. sanguineus*.

Palavras-chave: Agroecologia, agricultura orgânica, controle alternativo, alecrim, cúrcuma, açafraão, Basidiomycota.

ABSTRACT

***Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* and *Pycnoporus sanguineus* formulated extract to the control of *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato: shelf life, concentration and time of spraying**

Due the environmental pollution and damages in non-target organisms, by the indiscriminate use of pesticides in agriculture, it is necessary the search for new plant diseases control technology. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* and the control of early blight and bacterial spot on tomato plants, using stable formulation, as soluble powder, from *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa* and *Pycnoporus sanguineus* fruiting body. To determine the shelf life, the soluble powder was kept at 40 °C during 0, 60, 120 and 180 days and assayed with five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹). When the shelf life and the best concentrations were defined, it was evaluated the time-interval of spraying of seven, 14 and 21 days. As control treatments were used the fungicides azoxystrobin (200 mg of active ingredient – a.i L⁻¹) to early blight and oxychloride (400 mg a.i. L⁻¹) to bacterial spot. There were no *in vitro* antifungal and antibacterial activities from all extracts. The calculated concentration of *P. sanguineus* extract for the best control of diseases was 130 mg L⁻¹, with 24 months of shelf live to soluble powder. *In vivo*, the three extracts, spraying weekly gave the same control of fungicides to early blight and bacterial spot, with values of disease reduction up to 75% for rosemary and turmeric and 79% for *P. sanguineus*. These results show that the aqueous extract obtained from *R. officinalis*, *C. longa* and *P. sanguineus* soluble powder formulation, can protect tomato plants against early blight and bacterial spot, probably by resistance induction.

Keywords: Agroecology, organic growth, alternative control, rosemary, turmeric Basidiomycota.

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos pode ter, em curto prazo, efeito positivo para o produtor. No entanto, em longo prazo, além da seleção de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos, devido à poluição ambiental e intoxicações.

A conscientização sobre os riscos decorrentes do uso de agrotóxicos tem levado ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de sistemas de produção orgânica para os diversos tipos de cultura, principalmente na olericultura. Isto se justifica no propósito de atender aos médios e pequenos produtores, como alternativa de cultivo que apresenta redução de custos, melhor conservação do solo e da água e melhor qualidade de vida do produtor e sua família. Tendo em vista a formação de mercados consumidores cada vez mais exigentes quanto à qualidade do produto agrícola, trabalhos vêm sendo desenvolvidos através da investigação da atividade biológica de compostos secundários presentes em plantas medicinais e em alguns fungos. Tais compostos podem constituir-se em mais uma opção de controle alternativo de doenças em plantas, principalmente em áreas de cultivo orgânico.

Desta forma, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças e, uma das alternativas que tem demonstrado resultados promissores, é a indução de resistência, que consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta. A indução de resistência em plantas a patógenos pode ser conseguida com a aplicação de produtos de origem biótica (como fragmentos de células de leveduras ou de cogumelos e extratos de plantas medicinais) ou de origem abiótica (como produtos derivados do ácido salicílico).

O desenvolvimento de métodos alternativos de controle como o uso de produtos naturais com atividades antimicrobianas diretas e/ou indutoras de resistência, como aquelas extraídas de plantas medicinais e de fungos, poderá contribuir para a redução dos danos causados pelas doenças, principalmente em áreas de cultivo orgânico, particularmente em tomateiro, cuja produção é dependente da utilização massiva de defensivos.

O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e a indução de resistência no tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* adequando formulações estáveis a partir de extratos aquoso das plantas medicinais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e cúrcuma (*Curcuma longa*) e do fungo *Pycnoporus sanguineus*, para determinar o tempo de prateleira, intervalo de aplicação e dose dessas formulações com vistas ao possível registro dos mesmos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO TOMATE NO BRASIL

O plantio de tomate *Solanum lycopersicum* L. (Sin.: *lycopersicon esculentum* Mill) tem relevância para o Brasil, tanto pela sua representação em área plantada, como pela sua importância na dieta básica de toda a população brasileira nas formas *in natura* e processada (TAVARES, 2003).

O tomateiro é originário da América do Sul e cultivado em quase todo o mundo. Um dos principais fatores para a expansão da cultura é o crescimento do consumo. Entre 1985 e 2005, o consumo mundial *per capita* de tomate cresceu cerca de 36%, passando de 14 kg por pessoa por ano para 19 kg, de acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (SANTOS et al., 2009).

A demanda por tomate tem sido reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis, favorecendo também o crescimento da venda do produto fresco. O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno, substância essa que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo (CARVALHO & PAGLIUCA, 2007).

A produção de tomate no Brasil, em 2011, atingiu 3,6 milhões de toneladas, sendo a Região Sudeste responsável por 38,99% do total produzido. A maior produção de tomate no Brasil está concentrada nos Estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia. Dentro da Região Sudeste o Estado de São Paulo é o maior produtor, sendo responsável por 45,53% da produção. A segunda maior região produtora é o Centro-Oeste, que apresentou uma participação de 28,16% da produção nacional no mesmo ano. O Estado de Goiás é o maior produtor do país. Sozinho, este estado produziu em 2011 a quantidade de 1.010.449 toneladas de tomate, equivalente a 23% da produção nacional (IBGE, 2011).

O cultivo exige alto nível tecnológico e intensa utilização de mão-de-obra. Apesar do elevado índice de mecanização nas operações de preparo de solo, adubação, transplante, irrigação e pulverização, são necessários cerca de 100 homens/dia/ha, na execução das tarefas de capinas e colheitas manuais, o que dá a essa cultura elevada importância econômica e social (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2003).

O tomateiro exige o uso de grandes quantidades de agroquímicos devido a sua grande suscetibilidade a uma ampla gama de patógenos e, na agricultura convencional, as doenças de plantas têm sido controladas principalmente através do uso desses produtos. Entretanto, as pesquisas indicam que mesmo com o aumento expressivo do uso de agrotóxicos, as perdas atribuídas a doenças e pragas não sofreram uma redução drástica e os ganhos de produtividade não foram significativos (FIORI-TUTIDA, 2003).

De acordo com os resultados do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas do Instituto Biológico (IB) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, o tomate encontra-se entre as hortaliças com maior nível de resíduos de produtos fitossanitários. Verificou-se por este diagnóstico o uso de inseticidas, fungicidas, formicidas e herbicidas em 18 importantes culturas da agricultura paulista, sendo o tomate uma das mais problemáticas quanto ao uso de agrotóxicos, registrando-se elevado percentual de intoxicações em trabalhadores envolvidos com a aplicação de agrotóxicos nessa cultura além de resíduos nesses alimentos (VICENTE et al., 2002).

2.2 MANCHA BACTERIANA - *Xanthomonas vesicatoria*

É uma doença de ocorrência muito freqüente e destrutiva em condições de elevada umidade, precipitação e temperaturas entre 20 e 30 °C. O tomateiro é suscetível em qualquer idade e todos os órgãos da parte aérea são afetados. Nas folhas os sintomas iniciais são pequenas áreas de tecido encharcado, de forma circular ou irregular, que mais tarde necrosam, apresentando coloração parda de intensidade variável. O diâmetro da lesão varia de 1 a 5 mm em função da umidade e da variedade. As áreas lesionadas, quando secas e examinadas pela face inferior das folhas, possuem aspecto brilhante devido à exsudação bacteriana. É freqüente o sintoma de necrose nos bordos e ao longo de ferimentos nas folhas (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000).

Nas ráquis florais, a necrose é circular, expondo, com freqüência, o lenho. As sépalas e os frutos também são afetados. Nos frutos, o tamanho e o número de lesões dependem da variedade, tipo de solo cultivado (em solos arenosos estes são maiores), chuvas e ventos. Os sintomas nos frutos iniciam-se com pequenas áreas encharcadas que depois necrosam e aumentam de tamanho, originando lesões deprimidas ou levemente salientes, de aspecto corticoso. Quando a incidência ocorre em frutos pequenos, pode provocar sua deformação ou queda. Estas lesões apresentam-se de cor parda variável. A doença não mata a planta, mas dependendo da suscetibilidade da variedade, pode causar redução na produtividade e qualidade dos frutos (KUROZAWA & PAVAN, 2005).

Etiologia

A mancha-bacteriana era até recentemente classificada por um grupo homogêneo de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Atualmente, no entanto, admite-se que esta doença seja causada por quatro espécies diferentes, compreendendo quatro grupos genéticos / fenotípicos e três raças: *X. euvesicatoria* (grupo A raça / T1), *X. vesicatoria* (grupo B / raça T2), *X. perforans* (grupo C raça / T3) e *X. gardneri* (grupo D / raça T2)

(JONES et al., 2004). A distinção destas se dá por meio de testes bioquímicos e moleculares e todas são encontradas no Brasil, sendo que para efeito de estudos, este trabalho foi utilizado o grupo (*X. vesicatoria*) proveniente da Embrapa CNPH/Brasília/DF, isolado da região de Caçador/SC, e também por ser distribuído por todo território nacional. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, baciliforme, móvel através de um flagelo polar, podendo formar cápsula. Em meio de extrato de carne as colônias são amarelas (KUROZAWA & PAVAN, 2005).

Epidemiologia

Epidemias são favorecidas por condições de alta umidade que favorecem a multiplicação, disseminação, penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro. Ventos fortes associados as chuvas pesadas também favorecem a disseminação da bactéria dentro da cultura ou entre culturas próximas. A disseminação planta a planta também ocorre por respingos de água de chuva ou irrigação por aspersão, implementos agrícolas, pelos trabalhadores durante os tratos culturais e, à longa distância, por meio de sementes contaminadas (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997).

A bactéria penetra na planta através dos estômatos, hidatódios e ferimentos. Após a penetração, mesmo se a umidade do solo e do ar for baixa, a bactéria pode multiplicar e provocar um leve amarelecimento e /ou necrose internerval nos folíolos. Poucas horas após uma chuva mais pesada, áreas com encharcamento na face inferior dos folíolos podem ser constatadas. Em geral, as folhas velhas e as medianas são mais afetadas (AGRIOS, 2005).

O patógeno pode sobreviver em restos de cultura e em outras plantas hospedeiras, tais como pimenteiras, pimentão, berinjela, batateira, tomateiro selvagem, *Solanum nigrum*, *Datura* spp. e *Physalis* spp. Nestas, a bactéria pode sobreviver como epífita, raramente causando lesões em seus órgãos. Embora seja relatada na literatura como sendo um patógeno polífago, são conhecidas raças especializadas em uma ou outra espécie de hospedeiro. Sob o ponto de vista prático, isto significa que a ocorrência de alta incidência da doença em um plantio de tomateiro não implica, necessariamente, em alta incidência de plantios posteriores de outro hospedeiro qualquer, como pimentão, por exemplo, (KUROZAWA & PAVAN, 2005).

Controle

X. vesicatoria, agente causal da mancha bacteriana é muito freqüente e destrutiva em condições de elevada umidade, cujo controle só é efetivo quando se aplica um conjunto de medidas de caráter preventivo, como evitar o plantio em locais anteriormente cultivados

com tomateiro, obedecendo a rotação de cultura num período de no mínimo três anos, evitar o plantio próximo de outras solanáceas, tratar as estacas de tutoramento, mourões, arames, bandejas de semeadura e madeiramento dos barracões com produtos que eliminem possíveis fontes do patógeno e o uso de genótipos resistentes (KUROSZAWA & PAVAN, 2005).

2.3 PINTA PRETA – *Alternaria solani*

A pinta preta caracteriza-se por ser uma das mais importantes e freqüentes doenças da cultura do tomateiro nas condições brasileiras de cultivo. A doença apresenta alto potencial destrutivo, incidindo sobre folhas, hastes pecíolos e frutos do tomateiro, ocasionando elevados prejuízos econômicos. As perdas são diretas através da infecção de frutos e indiretas através da redução do vigor da planta, além de danos aos frutos expostos aos raios do sol em decorrência da desfolha. A maior severidade da doença ocorre durante a fase de frutificação (VALE et al., 2000).

Etiologia

O agente causal da pinta preta *A. solani* (Ellis & Martin) L.R. Jones & Grout, foi descrito pela primeira vez em 1882. O fungo se caracteriza pela produção de conidióforos septados, sub-hialinos a escuros, com conídios produzidos terminalmente. Os conídios são tipicamente escuros, septados longitudinalmente e transversalmente, e clavados, com extremidade pontiaguda com ou sem bico. O fungo pertence ao grupo de fungos Mitospóricos, ordem Moniliales e família Dematiaceae (VALE et al., 2000).

Sintomas

Esta doença afeta toda a parte aérea da planta, a partir das folhas mais velhas e próximas ao solo. A pinta preta normalmente não ataca folhas novas, o que a diferencia da mancha-de-estenfilio, da pinta bacteriana e da mancha bacteriana. Na folha, a doença caracteriza-se pela presença de manchas grandes, escuras, circulares, com anéis concêntricos. O ataque severo provoca desfolha acentuada e expõe o fruto à queima de sol. Também é comum o aparecimento de cancro no colo e nas hastes. Nesse caso, o sintoma é caracterizado por lesões grandes, com anéis concêntricos, semelhantes aos que ocorrem nas folhas. Nos frutos, verifica-se uma podridão deprimida, grande circular, próxima ao pedúnculo, coberta por mofo preto na superfície (KUROSZAWA & PAVAN, 2005).

Se forem utilizadas sementes infectadas, podem ocorrer podridão de sementes e morte de plântulas em pré e pós-emergência. As mudas pequenas podem apresentar

sintomas de necrose do colo, caracterizados pelo anelamento da base do caule, apresentando crescimento retardado e murchando até a morte (VALE et al., 2000).

Epidemiologia

A ocorrência de epidemias severas desta doença está associada a uma faixa de temperatura diária de 25 a 32 °C e as temperaturas mínimas, ótimas e máximas para a germinação dos conídios estão em torno de 5, 27 e 32 °C, respectivamente. A presença de água na superfície da folha é fundamental para a germinação, infecção e esporulação do fungo. A esporulação abundante de *A. solani* ocorre na faixa de 14 a 26 °C, com umidade relativa de 100% durante 24 horas. Sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, podem ocorrer vários ciclos secundários de duração relativamente curto durante o ciclo da cultura, levando ao surgimento de epidemias (KUROSZAWA & PAVAN, 2005).

Controle

Segundo Embrapa hortaliças (2003), não existem cultivares comerciais resistentes, devendo-se pulverizar preventivamente com os fungicidas registrados para essa doença. O fungo sobrevive nos restos culturais e infecta outras hortaliças como a batata e a berinjela, além de invasoras como o “juá-de-capote”. Como a doença é transmitida também por sementes recomenda-se incorporar os restos culturais imediatamente após a última colheita e fazer rotação de cultura com gramíneas.

2.4 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

Controle alternativo é o controle de doenças, o qual inclui o controle biológico, a indução de resistência em plantas (MORAES, 1992) e o uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e ou indutores de resistência (SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

O controle biológico pode ser definido como o controle de um microrganismo antagônico, o qual pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (COOK & BAKER, 1983). A indução de resistência será abordada a seguir.

2.4.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Toda planta na natureza se desenvolve sob constante ameaça de seus inimigos, sejam eles herbívoros ou patógenos. Todavia, as plantas não aceitam passivamente essa agressão, mas apresentam barreiras já existentes antes do ataque, que visam conter esta agressão. Estas barreiras são denominadas de defesas constitutivas e são representadas por

estruturas, como ceras, cutícula, espessamento de parede celular, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como por substâncias químicas pré-formadas como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI, 2011; STANGARLIN et al., 2011a). Por outro lado, há mecanismos de defesa que se manifestam somente quando a planta é desafiada por um agressor. Estes mecanismos envolvem a formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, além de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e espécies reativas de oxigênio (CAVALCANTI et al., 2005a; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011 a).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (BONALDO et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2005b; HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). Os agentes indutores capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (SMITH, 1996), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos ou ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999).

A ativação das defesas das plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas (STANGARLIN et al., 1999; BETTIOL & STADNIK, 2001; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005; STANGARLIN et al., 2008), preparações de cogumelos (DI PIERO et al., 2005; ASSI, 2005; BALDO et al., 2011; DI PIERO et al., 2006), preparações de leveduras (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; PASCHOLATI, 1998; STADNIK & BETTIOL, 2000; STANGARLIN et al., 2010), preparados homeopáticos (TOLEDO et al., 2011), exopolissacarídeos bacterianos (BACH et al., 2003; CASTRO & BACH, 2004), rizobactérias promotoras de crescimento (VISWANATHAN & SAMIYAPPAN, 2002), fungos promotores de crescimento (MADI & KATAN, 1998), e ainda raças não virulentas do patógeno (MONOT et al., 2002), além do próprio patógeno inativado pelo calor (BACH et al., 2003). Pode-se ainda utilizar elicitores químicos ou físicos, como silício (Si) (CARRÉ-MISSIO et al., 2010), ácido D-L-aminobutírico (BABA) (HWANG et al., 1997), quitosana (COQUEIRO et al., 2011 a, b, c), acibenzolar-S-metil (ASM) (OSSWALD et al., 2004; SOARES & MARINGONI, 2002) ou luz em comprimentos de onda específicos (KHANAM et al., 2005).

2.5 EXTRATOS DE PLANTAS

Nos últimos anos muitos extratos de plantas vêm sendo estudados e utilizados para o controle ou manejo de doenças de plantas devido à presença de substâncias presentes no tecido destas que podem apresentar ação biológica diretamente contra os patógenos ou induzir resistência, nas plantas em que são aplicados, contra uma ampla gama de patógenos (STANGARLIN et al., 2011 b). Neste contexto Daayf et al. (1995) e Konstantinidou-Doltsinis & Schmidt (1998) trataram plantas de pepino com extrato de *Reinoutria sachalinensis* e observaram drástica redução da severidade de *Sphaerotheca fuliginea* agente causal do míldio associado a aumentos na produtividade.

Por outro lado, no Brasil diversas pesquisas têm sido feitas para identificar plantas cujo extrato bruto apresente substâncias com ação biológica contra patógenos de plantas ou que induza resistência (FIORI et al., 2000; MOTOYAMA et al., 2003a,b; SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; BALBI-PEÑA et al., 2006a,b; CARRÉ et al., 2006).

Franzener et al. (2003) controlaram a mancha marrom (*Bipolaris sorokiniana*) em trigo usando extrato aquoso de *Artemisia camphorata* (cânfora). Carneiro (2003) verificou o controle do oídio (*Oidium lycopersici*) do tomateiro pelo óleo emulsionável de *Azadirachta indica* (nim). Bonaldo et al. (2004) observaram o controle da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em pepino pelo extrato de *Eucalyptus citriodora*. Rodrigues et al. (2006) estudaram o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em alface por *Zingiber officinalis* (gengibre).

Kuhn et al. (2006), estudando o efeito de *Curcuma longa* (cúrcuma ou açafrão) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, verificaram que *in vitro*, o extrato apresentou ação bactericida para concentrações que variaram de 10 a 20%, dependendo da procedência dos rizomas, mas, no entanto, *in vivo*, nas concentrações utilizadas, não houve efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno.

Kuhn et al. (2008) verificaram que extratos de cúrcuma (10%) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) (10%) foram tão eficientes quanto os tratamentos controle com oxicloreto de cobre (4 g/L) e ASM (50 mg/L) no controle de *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro “Débora Plus” em cultivo protegido.

Balbi-Peña et al. (2006 b) trabalharam com extrato de *C. longa* (cúrcuma) e solução de curcumina para controle de *A. solani* em tomateiro em cultivo protegido, utilizando como tratamentos controle acibenzolar-S-metil (ASM), um fungicida protetor (oxicloreto de cobre) e um fungicida sistêmico (azoxystrobin). Todos os tratamentos apresentaram valor de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) estatisticamente menor do que a testemunha. Dentre os mesmos, o tratamento com ASM foi o menos eficiente, mas não diferindo estatisticamente de cúrcuma 10% e curcumina 100 mg/l. Cúrcuma 1%,

curcumina 50 mg/l e oxicleto de cobre apresentaram melhor nível de controle, mas ainda inferior estatisticamente ao obtido pelo fungicida azoxystrobin. Não houve diferenças estatísticas na produção e no número de frutos comerciais, nem na massa fresca média de frutos entre tratamentos. Quanto ao tamanho dos frutos, o tratamento de curcumina 50 mg/l foi o único que apresentou menor porcentagem de frutos pequenos, e maior de frutos grandes, em relação à testemunha. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à porcentagem de frutos de tamanho médio.

Outro trabalho é o de Becker et al. (2004), com extratos de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *C. longa* (cúrcuma) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) para controle de doenças de final de ciclo (*Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*) e oídio (*Microsphaera diffusa*) em soja em condições de campo. O tratamento com curcumina a 50 mg/l proporcionou peso total de sementes de soja 29% maior que o obtido com o tratamento padrão com o fungicida pyraclostrobin + epoxiconazole. Extratos de *C. citratus* e *C. longa* a 5% proporcionaram o mesmo nível de controle de DFC que o fungicida utilizado para comparação. *C. citratus* e *R. officinalis* a 5% e *C. longa* a 5 e 10% foram tão eficientes quanto o fungicida no controle de oídio. Alguns extratos, como o de *C. longa* a 10%, além do eficiente controle de DFC e oídio em soja, permitiu obter uma produtividade 16% maior (equivalente a 535 kg a mais por ha) em relação ao tratamento com o fungicida.

Röder (2006) conduziu ensaios em condições de campo (cultivo orgânico) com dois cultivares de morangueiro, ‘Camarosa’ e ‘Dover’, para controle de *Rhizopus* sp. e *Colletotrichum fragariae*, utilizando extratos aquosos de alecrim e arruda (*Ruta graveolens*). Verificou-se para ‘Camarosa’ que os tratamentos com alecrim reduziram em média 51,2% a quantidade de doença quando comparados com a testemunha (água). Esse valor foi similar àquele obtido com o tratamento com calda bordaleza (tratamento padrão utilizado pelo produtor em sistema orgânico de cultivo), no qual a redução na incidência de doença foi de 52%. Para os tratamentos com arruda a redução de doença foi de 39% em média. Isto se refletiu diretamente na produção de morangos, onde os tratamentos com alecrim permitiram incremento médio de 214% na produção em comparação com a testemunha e de 58% em relação ao tratamento com calda bordaleza. Para arruda, o incremento médio foi de 223% em relação à testemunha e de 67% em relação à calda bordaleza. No caso específico dos extratos de alecrim e arruda a 10% o incremento na produção foi em torno de 326%. O tratamento com calda bordaleza incrementou em 156% a produção em relação à testemunha. Para ‘Dover’ os tratamentos com alecrim permitiram incremento médio de 127% na produção em comparação com a testemunha. Para arruda, o

incremento médio foi de 131% em relação à testemunha. O tratamento com calda bordaleza incrementou em 154% a produção em relação à testemunha.

2.5.1 Alecrim e seu uso para o controle de fitopatógenos

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta da família Labiaceae, perene, arbusto aromático, muito ramificado, chegando até a 1 m de altura (CORRÊA et al., 1998). Originária da Europa possui as seguintes propriedades químicas: óleos essenciais e borneol, acetato de bornila e α pireno, dextrogina, canfeno, cânfora, eucaliptol, saponina, ácidos orgânicos, flavonóides e ácido nicotínico (FRANCO, 1996). O óleo essencial obtido das folhas é constituído principalmente de timol (50 – 60%) e carvacrol (5 – 8%), acompanhado de p-cimeno (12 – 27%), cis-cariofileno (1 – 10%), γ -terpineno (6%), mircenol (2%) e outros terpenos em menores quantidades. O timol é antimicrobiano, destacando-se sua atividade contra espécies de *Penicillium*. O carvacrol é antifúngico e anti-helmíntico usado na veterinária (CAMARGO, 1998).

Com relação ao controle de doenças em plantas, Cruz et al. (1999), trabalhando com água destilada aromatizada de plantas medicinais no tratamento de sementes de trigo, dentre elas o *Rosmarinus*, para o controle de *Rhizopus* sp., obtiveram em todos os tratamentos maior percentual de plântulas normais sadias, superior ao controle.

2.5.2 A cúrcuma e seu uso para o controle de fitopatógenos

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta da família Zingiberaceae, originária do sudeste asiático. O interesse econômico da cultura está baseado nos principais componentes qualitativos dos rizomas: corante curcumina e óleos essenciais (CECÍLIO FILHO, 1996).

Utilizada desde a antiguidade na medicina e gastronomia do oriente, a cúrcuma vem se tornando importante, atualmente, no combate a vários problemas de saúde humana, podendo-se destacar alguns efeitos de seus componentes como: antiinflamatório (ARAÚJO & LEON, 2001; BALASUBRAMANYAM et al., 2003), antioxidante (LEAN & MOHAMED, 1999; SCARTEZINI & SPERONI, 2000; BALASUBRAMANYAN et al., 2003) e atividades contra protozoários (ARAÚJO et al., 1998 e 1999), bactérias (UECHI et al., 2000), fungos (APISARIYAKUL et al., 1995), e nematóides (ARAÚJO & LEON, 2001).

As ações citadas estão ligadas a uma série de compostos presentes no rizoma da cúrcuma. Este rizoma é muito rico em compostos fenólicos benéficos, como os curcuminóides. Os curcuminóides estão quimicamente relacionados ao seu principal

ingrediente, a curcumina. Três principais curcuminóides foram isolados da cúrcuma: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina (BALASUBRAMANYAM et al., 2003).

O uso de extrato de cúrcuma para o controle de fitopatógenos é relatado por Saju et al. (1998), que determinaram a atividade fungistática através da inibição do crescimento micelial *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sphaceloma cardamoni*, *Pestalotia palmarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. Singh & Raí (2000) verificaram que o extrato de cúrcuma apresentou fungitoxidade *in vitro* através da inibição do crescimento micelial de *Fusarium udum*. Raja & Kurucheve (1998) obtiveram redução no crescimento e na germinação *in vitro* do escleródio de *Macrophomina phaseolina* com extrato de cúrcuma.

Kuhn et al., (2006) estudou o efeito do extrato aquoso de cúrcuma em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihots* *in vitro*, e verificaram que o mesmo apresentou ação bactericida. *In vivo*, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito curativo em manivas de mandioca infectadas com o patógeno.

Singh et al. (2002) estudaram o efeito de óleos essenciais de *C. longa* sobre vários fungos. O óleo essencial na concentração de 1000 ppm causou inibição micelial completa em *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme* e a 2000 ppm em *Curvularia pallescens*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.

Balbi-Peña et al. (2006 b) estudaram o efeito de cúrcuma a 10% em plantas de tomateiro sobre *A. solani*, provocando uma possível indução de resistência sistêmica.

2.6 EXTRATOS DE FUNGOS

Dentre os diversos agentes bióticos e abióticos, utilizados em trabalhos de indução de resistência de plantas a patógenos, os cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* vêm se destacando (STANGARLIN et al., 2011b). Porém, extratos de outras espécies vêm sendo estudados para esse fim, como é o caso do fungo *Pycnoporus sanguineus*, que vem demonstrado potencial na indução de resistência para o controle de diversas doenças de plantas.

Di Piero & Pascholati (2004) verificaram o efeito indutor de resistência pelo uso de extrato aquoso de basidiocarpos de *Agaricus blazei* em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*.

Di Piero et al. (2006) verificaram que o fracionamento com sulfato de amônia do extrato bruto de *Lentinula edodes*, foi capaz de isolar proteínas indutoras de peroxidases, as quais apresentaram redução na severidade de antracnose em plântulas de pepino.

Fiori-Tutida et al. (2007), estudando o uso de extratos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *A. blazei* na indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana*, concluiu que os extratos brutos de basidiocarpos desses fungos possuem atividade eliciadora de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo e cotilédones de soja.

2.6.1 *Pycnoporus sanguineus*

Evidências genéticas e morfológicas indicam a presença de três espécies para o gênero *Pycnoporus*: *P. cinnabarinus*, que ocorre em regiões de clima temperado no hemisfério Norte; *P. coccineus*, que ocorre em regiões de clima temperado do hemisfério Sul e em países vizinhos a Índia e Oceano Pacífico; e *P. sanguineus* que ocorre em regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios Norte e Sul (NOBLES & FREW, 1962).

P. sanguineus é uma espécie cosmopolita muito chamativa por sua cor vermelho-alaranjado. É um fungo do tipo saprófita de crescimento lento, pertencente a Divisão Basidiomycota, da família Polyporaceae. Este fungo tem basidiocarpo duro e lenhoso, geralmente encontrado em troncos em processo de apodrecimento. São encontrados ao longo dos trópicos e podem apresentar benefícios medicinais significantes. *P. sanguineus* possui componentes para o tratamento de reumatismos, artrites e gota (NATURAL, 2008).

A atividade antimicrobiana de *P. sanguineus* é conhecida desde 1946, quando Bose (1946) isolou poliporina, um composto ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sem toxicidade para animais (ROSA et al., 2003). Smânia et al. (1998) demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica a partir de um composto de pigmento alaranjado isolado desse fungo, denominado cinabarina, o qual possui uso na medicina popular no tratamento de várias doenças infecciosas, demonstrando atividade biológica contra espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e diversos membros do gênero *Streptococcus*, entre outros (SMÂNIA et al., 1995). Há, porém, grande variação nas atividades biológicas entre diferentes isolados (ROSA et al., 2003).

Dessoy (2003) realizando levantamento sobre a incidência de *P. sanguineus* na Região Centro Oeste do Rio Grande do Sul e análise de seus metabólitos secundários, observou a presença de cumarinas, flavonóides, esteróides e terpenóides no fungo em estudo, além de não haver diferenças qualitativas entre os extratos analisados quanto aos metabólitos secundários presentes.

Assi (2005), estudando o efeito da aplicação de extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* contra *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro, concluiu que houve o controle da antracnose e que o mesmo pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios do patógeno, quanto por indução de

resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases. Baldo et al. (2011) obteve resultados semelhantes para o mesmo patossistema, observando ainda a capacidade de indução de fenilalanina amônia-liase, β -1,3 glucanase e espécies reativas de oxigênio.

Viecelli et al. (2009 e 2010), estudando o efeito da aplicação de extratos de *P. sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola* em feijoeiro, concluíram que os extratos controlam a mancha angular através de atividade antimicrobiana sobre o patógeno e indução de peroxidases e polifenoloxidasas, de forma localizada e sistêmica.

Toillier et al. (2010) verificaram as atividades antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *P. sanguineus* para controle do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, utilizando extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura deste fungo. Foi observada atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* apenas para o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo em todas as concentrações avaliadas. *In vivo*, os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos para o controle desta doença em feijoeiro, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de resistência envolvendo a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase.

Iurkiv (2009) realizou trabalho objetivando a purificação parcial, através de cromatografia de filtração em gel, de compostos presentes em extrato bruto de basidiocarpos *P. sanguineus* eficientes na indução de mecanismos de defesa em cotilédones de soja. Foram obtidos cinco picos protéicos e um pico glicídico, com pesos moleculares variando de 1,82 a 5,18 kDa. O tratamento com extrato bruto (EB) a 20% mostrou-se eficiente na indução de fitoalexinas, sendo semelhante a *S. cerevisiae*, reconhecidamente indutora de gliceolina. A atividade de peroxidases foi inibida pelo EB 20%, e apesar de não diferirem estatisticamente da testemunha água, os demais tratamentos mostraram atividades maiores que a mesma, com destaque para fração glicídica, seguida das frações protéicas III (3,44 kDa) e V (1,82 kDa). Isso indica a presença de supressores no EB. A atividade de polifenoloxidasas apresentou tendência semelhante à enzima peroxidase, porém as frações obtidas por CFG não foram tão eficientes na indução de polifenoloxidasas como foram para peroxidases. A atividade de β -1,3 glucanases foi induzida pela fração protéica IV (2,79 KDa) que apresentou atividade 222,5% maior que a testemunha água. FAL foi grandemente induzida pelos picos protéicos III e V. De acordo com os resultados obtidos pôde-se selecionar as frações protéicas III, IV e V, além da fração de carboidratos como potenciais indutores de resistência em soja. Adicionalmente, verificou-se que as frações não possuem atividade inibidora da germinação de esporos

Phakopsora pachyrhizi e foram eficientes na redução do número de lesões de ferrugem asiática por cm² de folha.

3. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology** 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.

APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. V. 49, p. 163-169, 1995.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; LEON, L.L. *Leishmania amazonensis*: in vivo experiments with dirylheptanoids from laguminoseae and Zingiberaceae palnts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 93(supl. II), p. 306, 1998.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; CASTRO, D.; LIMA, M.E.F.; GOMES-CARDOSO, L.; LEON, L.L. Studies on the effectiveness of dirylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 94, p. 791-794, 1999.

ARAUJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.)**. Marechal Cândido Rondon, 51p. 2005. Dissertação (Mestrado) Universidade do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon.

BACH, E.E.; BARROS, B.C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xantham gum and heat-inactivated conidial suspension. **Journal of Phytopathology**. v. 151, p. 411-418. 2003.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, A.A.; KUMAR, R.S.; MONICKARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation; Novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**, v.28, n. 6, p. 715-721, 2003.

BALDO, M.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus* e inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n.4, p.174-179, 2011.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**. v.31, n.2, p.311-315, 2006a.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p.401-404, 2006b.

BECKER, A., VIGO-SCHULTZ, S.C., STANGARLIN, J.R., BALBI-PEÑA, M.I., KLAHOLD, C.A. & SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.(supl.), p.163, 2004.

BETTIOL, W.; STADNIK, M.J. Controle alternativo. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.) **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 165-192, 2001.

BOSE, S.R. Antibiotics in a *Polyporus* (*Polystictus sanguineus*). **Nature**, v.158, p.292-296, 1946.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. 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. 11-28. 2005.

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*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza/CE, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

CAMARGO, M.T.L. de A. **Plantas medicinais e de Rituais Afro-Brasileiros II: Estudos Etnofarmacobotânico**. São Paulo: Ícone, 1998. p. 75-85.

CARNEIRO, S.M.T.P.G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**. v.29, n.3, p.262-265, 2003.

CARRÉ, V.; STANGARLIN, J.R.; BECKER, A.; ZANELLA, A.L.; GONÇALVES Jr, A.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G.; CRUZ, M.E.S. Controle pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana (*Musa* sp.) por cânfora (*Artemisia camphorata*) e quitosana. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2006.

CARRÉ-MISSIO, V.; RODRIGUES, F.A.; SCHURT, D.A.; REZENDE, D.C.; RIBEIRO, N.B.; ZAMBOLIM, L. Foliar application of potassium silicate, acibenzolar-S-methyl and fungicides on the reduction of Pestalotia leaf spot on strawberry. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.3, p.182-185, 2010.

CARVALHO, J.L. de; PAGLIUCA, L. G. Tomate: um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, ano 6, n. 58, p. 6-14, jun. 2007.

CASTRO, O.L.; BACH, E.E. Increased production of β -1,3-glucanase and protein in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 42, p. 165-169. 2004.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, 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. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005a. p.81-124.

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, 2005b. 263p.

CECILIO FILHO, A.B. **Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Cúrcuma longa* L.)** Lavras. MG, 1996. 100p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. Petrópolis, RJ: Vozes, 1998. p. 68-81.

COQUEIRO, D.S.OLIVEIRA.; MARASCHIN, M.; DI PIERO, R.M. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.488-494, 2011a.

COQUEIRO, D.S.O.; DI PIERO, R.M. Antibiotic activity against *Xanthomonas gardneri* and protection of tomato plants by chitosan. **Journal of Plant Pathology**, v.93, p.337-344, 2011b.

COQUEIRO, D.S.O.; DI PIERO, R.M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, p.459-463, 2011c.

CRUZ, M.E.S.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; INOUE, M.H.; ÁVILA, M.R.; BATISTA, M.A.; STANGARLIN, J.R. Água destilada aromatizada de plantas medicinais no tratamento de sementes de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n.(supl.), p.278, 1999.

DAAYF, F.; SCHMITT, A.; BÉLANGER, R.R. The effect of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. **Plant Disease**. v. 79, p. 577-580. 1995.

DESSOY, E.C.M. **Incidência e análise fitoquímica de *Pycnopus sanguineus* na região de Santiago/RS**. In: 54ª Reunião Nacional de Botânica. Belém – PA, 2003. Disponível em: <<http://www.adaltech.com.br/>>. Acesso: 27 de julho de 2008.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**. v.30, n.1, 2004.

DI PIERO, R.M.; GARCIA Jr.,D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.29-50.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.175-180, 2006.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Cultivo de tomate para industrialização**. Importância econômica Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/tomate/index.htm> acesso em: 06 nov. 2003.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Phytopathologische Zeitschrift**. Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.

FIORI TUTIDA, Ana Cristina Grade; **Uso de extratos dos Cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinem no controle *in vitro* de *Puccinia recondita* f. sp *tritici* e na indução de resistência em trigo a *bipolaris sorokiniana***. 2003. 112p Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

FIORI-TUTIDA, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.287-289, 2007.

FRANCO, L.L. **As sensacionais 50 plantas medicinais, campeãs de poder curativo**. Curitiba: Ed. Santa Mônica, 1996. p. 31-60.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá/PR, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.) **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, p.177-199, 1997.

HWANG, B.K.; SUNWOO, J.Y.; KIM, Y.J; KIM, B.S. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.51, p.305-322, 1997.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. ISSN 0103-443X. Rio de Janeiro v.24 n.04 p.1-82 abr.2011

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* no controle de ferrugem asiática em soja**. 2009. 117p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

JONES, J.B., LACY, G.H., BOUZAR, H., STALL, R.E. AND SCHAAD, N.W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic Applied Microbiology**. v. 27, p. 755-762, 2004.

KHANANM, N.N.; KIHARA, J.; HONDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ARASE, S. Studies on red light-induced resistance of broad bean to *Botrytis cinerea*: I. Possible production of suppressor and elicitor by germinating spores of pathogen. **Journal of General Plant Pathogen**, v. 71, p. 285-288. 2005.

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. **Crop Protection**. v.17, n.8, p.649-656, 1998.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina/PR, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R.; BALDO, M.; IURKIV.; MEINERZ, C.; FRANZENER, G.; TRAUTMANN, R.R. Resistência induzida contra *Xanthomonas vesicatoria* afeta o metabolismo produtivo do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34 (supl), p. 35, 2008.

KUROZAWA, C; PAVAN, A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. v.2, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. p.690-719, 2005.

LEAN, L.P.; MOHAMED, S. Antioxidative and antimycotic effects to turmeric, lemon-grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and *Garcinia atroviridis* on butter cakes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 79. n. 13, p. 1817-1822, 1999.

LOPES, C.A; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças. Diagnose e Controle**. Brasília: Embrapa. 1997. 70p.

LOPES, C.A; QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOMIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Vol. 2. Viçosa: os editores. 2000. P.757-800.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. dos; AVILA, A.C. de; BEZERRA, J.C.; CHARCAR, J.M.; QUEZADA-DUVAL, A. M. Doenças: Identificação e controle. In: SILVA, J.B. da; GIORDANO, L de B(org). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa Hortaliças, 2000. p. 88-111.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**. v.53, p. 163-175, 1998.

MONOT, C.; PAJOT, E.; LE CORRE, D. SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**. v. 24, p. 75-81, 2002.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 1992, p. 175-190.

MOTOYAMA, M. M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI, A.C.G.; SCAPIM, C.A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá/PR, v. 25, n. 2, p. 509-512, 2003a.

MOTOYAMA, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI, 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**, Maringá/PR, v. 25, n. 2, p. 491-496, 2003b.

NATURAL-list. Disponível em: <<http://www.naturalist.com/medmushr.htm>>. Acesso em: 30 de julho de 2008.

NOBLES, M.K.; FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus* Karst. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.987-1016, 1962.

OSSWALD, W.; STANGARLIN, J.R.; NICHOLSON, R.L.; BRUMMER, M.; WULFF, N.A.; DI PIERO, R.M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.4, p.415-420, 2004.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. Vol. 1. São Paulo: Ceres, 2011. P. 593-636.

RAJA, J.; KURUCHEVE, V. Influence of plants extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**. v. 51, n. 1, p. 102-103, 1998.

RÖDER, C. Controle alternativo de antracnose e podridão de *Rhizopus* na cultura do morango em pré-colheita. Unioeste. 2006. (Dissertação de Mestrado). 47p.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre (aceito para publicação). **Summa Phytopathologica**, v.33, p.20-24, 2006.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.967-974, 2003.

SAJU, K.A.; VENUGOPAL, M.N.; MATHEW, M.J. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.) **Current Science**. v. 75. n. 7, p. 660-662, 1998.

SANTOS, W. J.; CARVALHO, R. M. M.; CABRAL, C. S.; REIS, A. **Seleção de híbridos e acessos de tomate para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3**. Brasília : Embrapa Hortaliças - Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Hortaliças – 62. 2009. 19 p.

SACARTEZZINI, P.; SPERONI, E. review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 23-43, 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. ; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, n.(supl), p.54-56, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.125-138.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Eds.) **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, bioquímica molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SINGH, R.; RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios**. v. 102(403), p. 165-173, 2000.

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, p. 75-81, 2002.

SMÂNIA, A.; DELLE MONADHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**. v.45, p.177-181, 1995.

SMÂNIA, E. de F. A.; SMANIA JUNIOR, A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4, p.317-320, 1998.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**. v. 132, p. 1-45. 1996.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. **Summa Phytopathologica**. v. 28, p. 41-45. 2002.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.95-116, 2000.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**. v. 20, n.1, p.16-21, 1994.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, v.2, n.11. p.16-22, 1999.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.16, p.265-304, 2008.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O.J. Induction of phytoalexins in soybean and sorghum by *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.91-98, 2010.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n.1, p.18-46, 2011a.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011b. p.1033-1042.

TAVARES, C.A.M. **Perspectivas econômicas da tomaticultura frente aos problemas causados pelo geminivírus**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v64_2/tavares.pdf> Acesso em: 11/agosto/2003.

TOILLIER, S.L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; VIECELLI, C.A.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.99-110, 2010.

TOLEDO, M.V.; STANGARLIN, J.R.; BONATO, C.M. Homeopathy for the control of plant pathogens. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. P.1063-1067.

UECHI, S.; MIYAGI, Y.; ISHIMINE, Y.; HONGO, F. Antibacterial activity of essential oils from *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) cultivated in Okinawa against foodborne pathogenic bacteria. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**. v. 44, n. 2, p. 138-140, 2000.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P.A.; COSTA, E. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. Viçosa; os editores, 2000. p. 699-756.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.87-96, 2009.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.73-80, 2010.

VICENTE, M.C.M.; CAMPBELL, A.; BAPTISTELLA, C.S.L.; COELHO, P.J.; LOPES JUNIOR, A. O uso de agrotóxicos em culturas selecionadas da agricultura paulista. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n.5, p. 34-44, 2002.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent *pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**. v.21, n.1-10, 2002.

CAPÍTULO I

EXTRATO FORMULADO DE *Rosmarinus officinalis* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

1. RESUMO

O uso de pesticidas pode ter, em curto prazo, efeito positivo para o produtor, no entanto, em longo prazo, o efeito pode se tornar negativo devido a contaminação ambiental e resíduos no produto vegetal. Desta forma, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria* e o controle da pinta preta e da mancha bacteriana no tomateiro, utilizando para tanto, produto formulado estável, na forma de pó solúvel, de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Para o teste de estabilidade, o pó solúvel foi armazenado a 40 °C por 0, 60, 120 e 180 dias e testado em cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Definidos o tempo de prateleira e a melhor concentração, avaliaram-se os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. Não houve *in vitro* atividade antifúngica e antibacteriana dos extratos. A concentração calculada de extrato de alecrim que resultou em menor severidade das doenças foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹, com tempo de prateleira do pó solúvel de 24 meses. *In vivo*, os extratos proporcionaram o mesmo nível de controle da pinta preta e da mancha bacteriana que os fungicidas utilizados, com eficiência de até 75%, em intervalo de aplicação de sete dias. Estes resultados demonstram a eficiência do controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro, provavelmente por indução de resistência, pelo extrato aquoso obtido de formulação pó solúvel de alecrim.

Palavras-chave: Agroecologia, agricultura orgânica, controle alternativo, alecrim.

2. ABSTRACT

***Rosmarinus officinalis* formulated extract to the control of *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato: shelf life, concentration and time of spraying**

The continuous use of pesticides protecting plants from diseases can result in several damages due the environmental pollution and food residues. Thus, it is necessary

the search for new plant diseases control technology. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* and the control of early blight and bacterial spot on tomato plants, using stable formulation, as soluble powder, from rosemary (*Rosmarinus officinalis*). To determine the shelf life, the soluble powder was kept at 40 °C during 0, 60, 120 and 180 days and assayed with five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹). When the shelf life and the best concentrations were defined, it was evaluated the time-interval of spraying of seven, 14 and 21 days. As control treatments were used the fungicides azoxystrobin (200 mg of active ingredient – a.i L⁻¹) to early blight and oxychloride (400 mg a.i. L⁻¹) to bacterial spot. There were no *in vitro* antifungal and antibacterial activities from extracts. The calculated concentration of rosemary extract for the best control of diseases was 130 mg L⁻¹, with 24 months of shelf live to soluble powder. *In vivo*, the rosemary extract gave the same control of fungicides to early blight and bacterial spot, with values up to 75% of disease reduction, with spraying at seven days. These results show that the aqueous extract obtained from rosemary soluble powder formulation, can protect tomato plants against early blight and bacterial spot, probably by resistance induction.

Keywords: Agroecology, organic growth, alternative control, rosemary.

3. INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) tem relevância para o Brasil, tanto pela sua representação em área plantada quanto pela importância na dieta básica das pessoas, pois é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno, substância que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo (CARVALHO & PAGLIUCA, 2007).

No entanto, esta cultura é suscetível a grande número de doenças, como a mancha bacteriana e a pinta preta. A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* é uma doença de ocorrência muito frequente e destrutiva em condições de elevada umidade, precipitação e temperaturas, sendo o tomateiro suscetível em qualquer idade e todos os órgãos da parte aérea são afetados (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000). A pinta preta, causada por *Alternaria solani* também é importante doença nas condições brasileiras de cultivo, devido ao seu alto potencial destrutivo (KUROZAWA & PAVAN, 2005). A ocorrência dessas doenças no tomateiro exigem cuidados extras, principalmente no caso de cultivo orgânico, em comparação com outras culturas mais resistentes, o que tem levado

muitos agricultores a optarem pelo cultivo convencional, fortemente dependente do uso de defensivos químicos (POPIA et al., 2007).

Análises de resíduos de pesticidas indicam que em 18,27% das amostras de tomate analisadas havia presença de agrotóxicos acima do limite máximo permitido, como fentoato e permetrina, como também de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura, como aldicarbe (ANVISA, 2008).

Assim, face aos problemas que tem sido verificados pelo uso contínuo de pesticidas para o controle de doenças, como a seleção de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, poluição ambiental e intoxicações, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas e, uma das alternativas que tem demonstrado resultados promissores, é o uso de extratos vegetais com propriedades antimicrobiana direta e/ou de indução de resistência, a qual consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta hospedeira (STANGARLIN et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido feitas para identificar plantas cujo extrato apresente atividade biológica para controle de fitopatógenos (FIORI et al., 2000; BALBI-PEÑA et al., 2006a,b; FRANZENER et al., 2007; ITAKO et al., 2008; COLPAS et al., 2009; ITAKO et al., 2009; CARLOS et al., 2010; FORMIGHIERI et al., 2010). No entanto, ainda pouco se pesquisou sobre o uso de extratos da planta medicinal *Rosmarinus officinalis* (alecrim) para o controle de doenças em plantas.

Röder (2006) conduziu ensaios em condições de campo (cultivo orgânico) com dois cultivares de morangueiro, ‘Camarosa’ e ‘Dover’, para controle de *Colletotrichum fragariae* no canteiro e de *Rhizopus* sp. em pós-colheita, utilizando extratos aquosos de alecrim e arruda (*Ruta graveolens*) em concentração de 10%, preparados no momento do uso e pulverizados quinzenalmente. A autora observou que para a cultivar ‘Camarosa’ o alecrim reduziu 51% em média a intensidade das doenças quando comparado ao tratamento padrão do produtor com Super Magro.

Kuhn et al. (2008) verificaram que extratos aquosos obtidos de folhas frescas de alecrim, em concentração de 10% (peso/volume) e aplicados a cada sete dias, foram tão eficientes quanto os tratamentos com oxicleto de cobre (4 g L^{-1}) e acibenzolar-S-metil (50 mg L^{-1}) para o controle de *X. vesicatoria* em tomateiro “Débora Plus” em cultivo protegido. Neste trabalho, no entanto, esses autores não testaram doses e intervalos de aplicação do extrato de alecrim, o qual era preparado no momento do uso.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e o controle no tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani*

utilizando formulações estáveis, obtidas a partir de extrato aquoso de alecrim, para determinar tempo de prateleira, intervalo de aplicação e dose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

Alternaria solani foi isolado a partir de lesões em folhas de tomateiro infectadas naturalmente, cultivado e mantido em meio V8 a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (BALBI-PEÑA et al., 2006a), e, para a esporulação, foi utilizada metodologia de Pulz & Massola Jr. (2009).

Para *Xanthomonas vesicatoria* foi utilizado o isolado 2010-24 proveniente de Caçador/SC e fornecido pela Embrapa - CNPH, o qual foi cultivado em meio ágar-nutriente a 25 °C e mantido no escuro por 72 h. A manutenção das bactérias ocorreu pelo método simples de armazenamento a -20 °C (MARIANO & ASSIS, 2000).

4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO

A partir de extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foi obtido um formulado pó solúvel, cujos detalhes metodológicos não são descritos em decorrência de processo de patenteamento. O pó solúvel obtido foi armazenado em embalagem de papel aluminizado impermeável (7 cm x 6,5 cm) contendo 1 g. Essas embalagens ou saches foram submetidos ao processo de envelhecimento acelerado em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C por seis meses, ao que, não havendo alteração na atividade biológica do produto durante este tempo de armazenamento, atribui-se ao mesmo a validade de 24 meses (ANVISA, 2004).

Com zero, 60, 120 e 180 dias de armazenagem os saches foram retirados e utilizados para avaliar a atividade biológica em ensaios *in vitro* (atividade antimicrobiana) e *in vivo* (controle de pinta preta e de mancha bacteriana no tomateiro). Para tanto, os formulados foram dissolvidos em água destilada esterilizada para obter concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, imediatamente antes do uso.

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para *A. solani* foi avaliada a germinação de conídios em lâmina de microscopia revestida com 800 µL de ágar-água 2% (STANGARLIN et al., 2010). Para tanto, alíquotas de 50 µL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados, e alíquotas de 50 µL de suspensão de esporos de *A. solani* (3x10⁴ conídios mL⁻¹), obtidos de uma cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das

lâminas. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz fluorescente durante 24 h a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada (BALBI-PENNA et al., 2006a). Após 24 h foram adicionados 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos esporos. Foram utilizadas três lâminas por tratamento. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento do seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

Para *X. vesicatoria*, 5 mL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados anteriormente, foram esterilizados em filtro de seringa (membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro) e adicionados assepticamente em tubo de ensaio com meio caldo nutriente. A concentração bacteriana foi acertada para todos os tratamentos em 4×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. A multiplicação bacteriana foi avaliada após 24 horas pela leitura de absorbância a 580 nm em espectrofotômetro.

Para estes ensaios foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial simples, considerando quatro tempos de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias) e cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹), com três repetições, cujos dados foram submetidos à análise de variância (FERREIRA, 2003).

4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO

4.4.1. Avaliação da concentração do formulado

Sementes de tomateiro híbrido Débora-Plus (Sakata Seed Sudamerica Ltda.) foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido com substrato comercial e mantidas em casa de vegetação climatizada a 28 °C +/- 3 °C. Após 30 dias as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 L (uma planta por vaso) contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (2:1:2) autoclavados (1 h a 121 °C e 1 atm, sendo repetida a operação 24 h após). Vinte dias após o transplante as plantas foram aspergidas até o ponto de escorrimento com os formulados nas concentrações indicadas. Três dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas com *A. solani* (3×10^4 conídios mL⁻¹) ou *X. vesicatoria* (4×10^8 UFC mL⁻¹) e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. A severidade das doenças foi avaliada no 28º dia após a inoculação utilizando escalas diagramáticas (BALBI-PENNA et al., 2006b; MELLO et al., 1997).

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial simples, considerando quatro tempos de armazenamento do formulado,

cinco concentrações, com três repetições, sendo que estes dados foram submetidos a análise de variância e os dados ajustados em análise de regressão e comparados individualmente com os tratamentos controle pelo teste de Dunett a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado

Para determinar o melhor intervalo de aplicação do formulado de alecrim para controle de pinta preta e mancha bacteriana no tomateiro, foram utilizados os mesmos procedimentos já descritos, com a particularidade de que foi utilizada apenas uma concentração do formulado e um tempo de armazenamento, os quais apresentaram melhor controle dessas doenças pelo ensaio anterior. Foram testados intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, mantendo-se as inoculações do patógeno sempre aos três dias após os tratamentos. Mesmo para os intervalos de sete e 14 dias ocorreram inoculações dos patógenos todas as semanas para simular a ocorrência de epidemias. Dessa forma, no total foram cinco, três e duas aplicações de formulado de alecrim para os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, respectivamente, além de cinco inoculações dos patógenos em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu aos 35 dias após a primeira inoculação.

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando três intervalos de aplicação e uma concentração do formulado, além dos tratamentos controle negativo (com água) e positivos (com fungicidas), com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de alecrim e do tempo de armazenagem do formulado pó solúvel sobre a germinação de conídios de *A. solani* não foi significativa (Tabela 1). A média geral de conídios germinados foi de 46,57%, indicando não haver com esse extrato solúvel atividade antimicrobiana direta sobre esse patógeno.

Resultados opostos foram encontrados por outros autores, onde o extrato bruto aquoso de alecrim, não submetido a tratamento térmico, foi fungitóxico contra *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (TAGAMI et al., 2009), o que foi verificado também por Pitarokili et al. (2008) contra *Sclerotinia*

sclerotiorum, *Sclerotium cepivorum*, *Phytophthora nicotianae* e *Fusarium* spp., por Camatti-Sartori et al. (2011) contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. isolados de gérbera e rosa, e por Scapin et al. (2010) contra *Exserohilum turcicum* isolado de milho pipoca.

Para *Alternaria solani*, Itako et al. (2008) verificaram que o extrato aquoso, obtido de folhas frescas de alecrim no momento do uso, inibiram em 79% a esporulação a partir da concentração de 10%, e em 60% a germinação de conídios para a concentração de 20% (ou 200.000 ppm), concentrações estas consideradas extremamente maiores, ou pelo menos 1000 vezes maior em relação à maior concentração utilizada neste trabalho, no valor de 200 mg L⁻¹ (ou ppm). Portanto, as concentrações relativamente baixas utilizadas neste trabalho, associado à temperatura de aproximadamente 106 °C durante a obtenção do pó solúvel, podem ter contribuído para a perda da atividade antimicrobiana desses extratos.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ² (mg L ⁻¹)	Dias ¹			
	0	60	120	180
0	50,00 ³	50,10	51,00	50,35
50	49,33	48,00	47,00	47,67
100	49,33	46,00	47,67	48,33
150	50,00	46,00	41,33	44,00
200	49,33	46,67	47,00	48,67
Média		46,57		
C.V. (%)		7,48		

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel;

³Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Quanto à atividade antibacteriana contra *X. vesicatoria*, também não se verificou efeito significativo para o tempo de armazenamento do pó solúvel e nem para a concentração do extrato aquoso de alecrim (Tabela 2). Verifica-se assim, que o extrato de alecrim nestes ensaios não mostrou atividade antimicrobiana contra *X. vesicatoria*. No entanto, para outros produtos derivados de alecrim, a literatura apresenta resultados diferentes. O óleo essencial de alecrim em concentrações de 4% e 8% inibiu *in vitro* a multiplicação de *Ralstonia solanacearum* isolada de tomateiro e de pimentão, respectivamente (MARTINS et al., 2009 e 2010). Da mesma forma, o óleo de alecrim a partir da concentração de 1% inibiu *in vitro* a multiplicação de *Xanthomonas axonopodis*

pv. *phaseoli* isolada de feijão vagem (VIGO-SCHULTZ, 2008). Deve-se ressaltar, entretanto, que o óleo essencial apresenta maior concentração de princípios ativos do que o extrato aquoso (MAIA, 2008), além do que, neste trabalho, foram testadas concentrações pelo menos 400, 200 e 50 vezes menores em relação às concentrações de 8%, 4% e 1%, respectivamente, utilizadas naqueles trabalhos, quando se considera a concentração de 200 mg L⁻¹.

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ²	Dias ¹			
(mg L ⁻¹)	0	60	120	180
50	0,691 ⁴	0,690	0,698	0,695
100	0,701	0,702	0,689	0,695
150	0,692	0,694	0,690	0,697
200	0,701	0,684	0,705	0,703
Controle ³	0,699	0,706	0,678	0,699
Média	0,695			
CV%	6,592			

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel;

³Caldo nutriente sem a presença de extrato de alecrim;

⁴Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração

Houve controle da pinta preta causada por *A. solani* em tomateiro tratado com extrato solúvel de alecrim, com a mesma eficiência do fungicida utilizado como tratamento padrão (Figura 1). Ao utilizar o extrato obtido de pó solúvel sem armazenamento (0 dias) houve redução linear da severidade da doença em relação à concentração, enquanto que para os demais tempos de armazenamento o efeito foi quadrático, mas mantendo-se a mesma eficiência, o que indica, portanto, validade ou tempo de prateleira desse produto de 24 meses na forma de pó solúvel. As concentrações a partir de 50 mg L⁻¹ para os tempos 60 e 180 dias e de 100 mg L⁻¹ para os tempos zero e 120 dias não diferiram do tratamento com fungicida. Para as equações quadráticas, a concentração calculada de extrato de alecrim que resultou em menor severidade da doença foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹.

Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração.

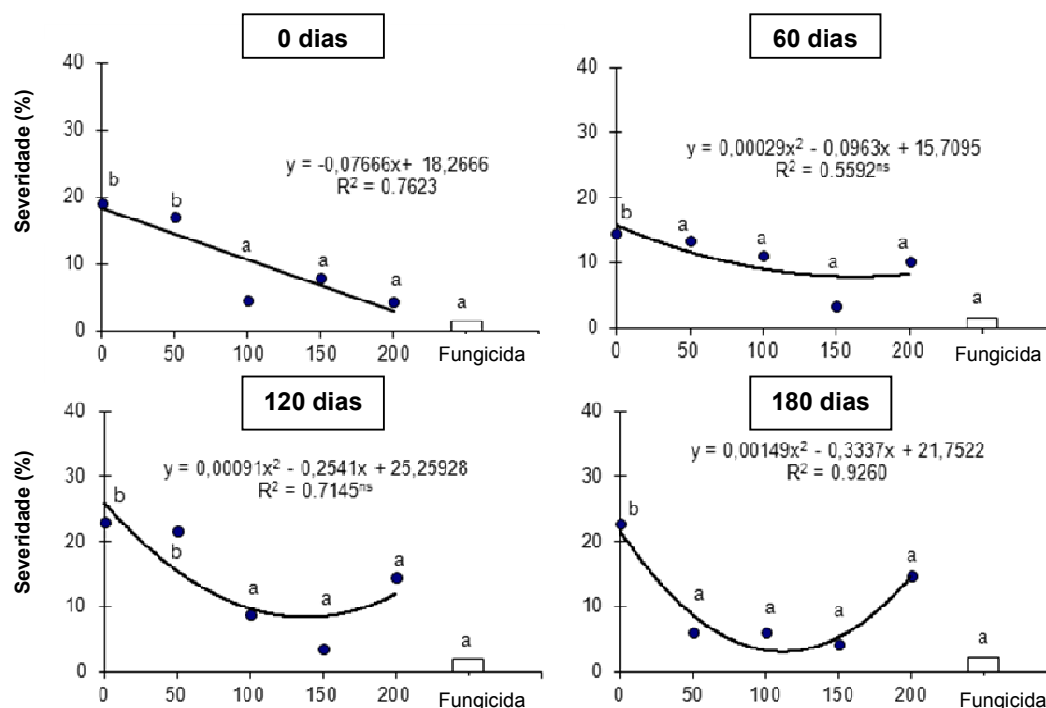


Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.

Para a mancha bacteriana, também houve controle desta doença pelo extrato aquoso de alecrim, com comportamento quadrático em relação às diferentes concentrações testadas (Figura 2). As concentrações de 100 e 150 mg L⁻¹ para os tempos 60 e 180 dias e de 150 mg L⁻¹ para os tempos zero e 120 dias de armazenamento do pó solúvel não diferiram do tratamento com fungicida. Dessa forma, como a eficiência do produto foi mantida, a validade ou tempo de prateleira do mesmo é de 24 meses na forma de pó solúvel. A concentração calculada de extrato de alecrim que resultou em menor severidade da doença também foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹. Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração.

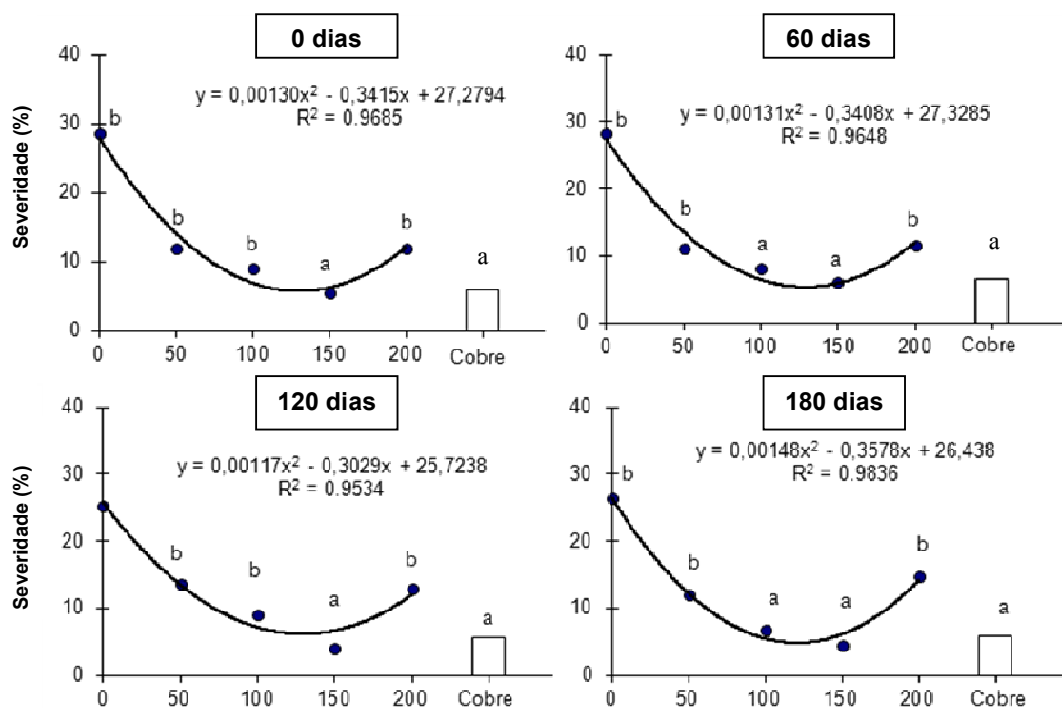


Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L^{-1}) de extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicleto de cobre (400 mg L^{-1}). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett $\leq 5\%$) em relação ao tratamento fungicida.

5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação

Houve controle de *A. solani* em plantas de tomateiro tratadas com extrato de alecrim (Tabela 3), com eficiência média de 61,10% em relação à testemunha água. O melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (71,66% de controle). No entanto, o extrato de alecrim aplicado em intervalos de sete e 14 dias não diferiu do tratamento com fungicida.

Para a mancha bacteriana (Tabela 4), a eficiência de controle proporcionada pelo extrato de alecrim foi de 62,76% em relação à testemunha água. O melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (75,82% de controle). No entanto, o extrato de alecrim aplicado em intervalos de sete e 14 dias não diferiu do tratamento com oxicleto de cobre.

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
Alecrim ¹	6,80 bC ³	9,80 bB	13,20 bA	61,10 ⁴
Fungicida ²	5,40 bB	7,80 bA	9,80 cA	69,96
Água	24,00 aB	25,40 aAB	27,20 aA	-
Média geral	14,38			
C.V. (%)	9,92			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Azoxystrobin (200 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 5%);

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
Alecrim ¹	5,60 bC ³	9,00 bB	12,8 bA	62,76 ⁴
Oxicloreto de cobre ²	5,00 bB	6,8 bAB	9,60 cA	70,92
Água	23,2 aB	23,6 aB	26,8 aA	-
Média geral	13,60			
C.V. (%)	13,58			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Oxicloreto de cobre (400 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 5%);

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

O uso de alecrim para controle de doenças no tomateiro foi relatado por Itako et al. (2009), que observaram redução da severidade da cladosporiose (*Cladosporium fulvum*) quando se utilizou o extrato aquoso em concentração de 10 e 20%, obtido de folhas frescas no momento do uso. Menezes et al. (2009) conseguiram controle de *A. solani* do tomateiro, em casa de vegetação, com extrato aquoso a 10%.

Em outros patossistemas, o extrato aquoso fresco de alecrim reduziu a incidência de antracnose (*Colletotrichum fragariae*) em condições de campo em frutos de morangueiro

(RÖDER et al., 2007), e o óleo de alecrim reduziu em 69% a área abaixo da curva de progresso da ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) em algodoeiro (SANTOS et al., 2011). No entanto, o óleo essencial não foi eficiente para o controle do crestamento bacteriano comum em feijão vagem em ensaio em casa de vegetação com o óleo na concentração de 0,5% (VIGO-SCHULTZ et al., 2009).

Neste trabalho, o controle da pinta preta e da mancha bacteriana proporcionado pelos extratos aquosos obtidos de formulado pó solúvel de alecrim, associado a ausência de atividade antimicrobiana direta sobre *A. solani* e *X. vesicatoria*, indicam que o provável mecanismo envolvido seja a indução de resistência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br.

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. 2008. Disponível em www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.311-315, 2006a.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p.401-404, 2006b.

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F.E.; CRIPPA, L.B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, L.T. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.6, p.117-122, 2011.

CARLOS, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; ITAKO, A.T.; BONALDO, S.M.; MESQUINI, R.M.; CARVALHO, J.B.; STANGARLIN, J.R. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 309-316, 2010.

CARVALHO, J.L. de; PAGLIUCA, L.G. Tomate: um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, ano 6, n. 58, p. 6-14, jun. 2007.

COLPAS, F.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FERRARESE, M.L.; SCAPIM, C.A.; BONALDO, S.M. Induction of plant defense responses by *Ocimum*

gratissimum L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 191-195, 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar versão 5.3**. DEX/UFLA. 2003.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 483-487, 2000.

FORMIGHIERI, A.P.; STANGARLIN, J.R.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillus-veneris* (L.) no controle de fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 487-496, 2010.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 27-36, 2007.

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

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JR., J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 75-83, 2009.

KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R.; BALDO, M.; IURKIV.; MEINERZ, C.; FRANZENER, G.; TRAUTMANN, R.R. Resistência induzida contra *Xanthomonas vesicatoria* afeta o metabolismo produtivo do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34 (supl.), p. 35, 2008.

KUROZAWA, C; PAVAN, A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. V.2, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. p.690-719, 2005.

LOPES, C.A; QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOMIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Vol. 2. Viçosa: os editores. 2000. p.757-800.

MAIA, J.G.S. Os óleos essenciais. In: BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. (Eds.). **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: EDUFES, 2008, p.48-69.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 37-47.

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* da bactéria *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.3, n.3, p.29-34, 2009.

MARTINS, E.S.C.S.; FARIAS, M.A.A.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M. Efeito dos óleos essenciais de citronela, alecrim e erva-cidreira no controle *in vitro* de *Ralstonia solanacearum* em pimentão. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.4, n.1, p.09-13, 2010.

MELLO, S.C.M., TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.447-448, 1997.

MENEZES, V.O.; PEDROSO, D.C.; DILL, A.M.; SANTOS, R.F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.1108-1112, 2009.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A. Composition of the essential oil of spontaneous *Rosmarinus officinalis* from Greece and antifungal activity against phytopathogenic fungi. **Journal of Essential Oil Research**, v.20, n.5, p.457-459, 2008.

POPIA, A.F.; CIDADE JÚNIOR, H.A.; HAMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; ASSIS, O. **Manual de olericultura orgânica**. Curitiba: EMATER/SEAB, 2007. 128 p.

PULZ, P.; MASSOLA JR., N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **SummaPhytopathologica**, v.35, n.2, p.121-126, 2009

RÖDER, C. Controle alternativo de antracnose e podridão de *Rhizopus* na cultura do morango em pré-colheita. Unioeste. 2006. (Dissertação de Mestrado). 47p.

RÖDER, C.; STANGARLIN, J.R.; PAZUCH, D.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle alternativo de podridões no morango com tratamentos em pré-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v.32 (suplemento), p.201, 2007.

SANTOS, B.T.; BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Óleos essenciais de espécies florestais e medicinais no controle da ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) em algodão. **Anais..Cadernos de Agroecologia, Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza-CE**, v.6, n.2, 2011.

SCAPIN, C.R.; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.1, p.57-61, 2010.

STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Estratégias de seleção e uso de extratos de plantas no controle microbiano *in vitro*. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Org.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ª ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v. 1, p. 293-345.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. P.1033-1042.

TAGAMI, O.K.; GASPARIN, M.D.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; ITAKO, A.T.; TOLENTINO JUNIOR, J.B.; MORAES, L.M.; STANGARLIN, J.R. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.2, p.285-294, 2009.

VIGO-SCHULTZ, S.C. Avaliação da indução de resistência no controle do cretamento bacteriano comum do feijão vagem. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 78p. 2008.

VIGO-SCHULTZ, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.; LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

CAPÍTULO II

EXTRATO FORMULADO DE *Curcuma longa* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

1. RESUMO

Apesar do efeito imediatista dos pesticidas para controle de doenças, seu uso continuado pode trazer sérias implicações agroecológicas. Desta forma, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria* e o controle da pinta preta e da mancha bacteriana no tomateiro, utilizando para tanto, produto formulado estável, na forma de pó solúvel, obtido de rizomas de cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa*). Para o teste de estabilidade, o pó solúvel foi armazenado a 40 °C por 0, 60, 120 e 180 dias e testado em cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Definidos o tempo de prateleira e a melhor concentração, avaliaram-se os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. Os extratos não apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro*. A concentração calculada de extrato de cúrcuma que resultou em menor severidade das doenças foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹, com tempo de prateleira do pó solúvel de 24 meses. *In vivo*, os extratos proporcionaram o mesmo nível de controle da pinta preta e da mancha bacteriana que os fungicidas utilizados, com eficiência de até 74,58%, em intervalo de aplicação de sete dias. Estes resultados demonstram a eficiência do extrato aquoso obtido de formulação pó solúvel de cúrcuma para controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro.

Palavras-chave: Agroecologia, agricultura orgânica, controle alternativo, açafrão.

2. ABSTRACT

***Curcuma longa* formulated extract to the control of *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato: shelf life, concentration and time of spraying**

Although the quickly and fast response of pesticides for controlling plant diseases, its continuous use can causes serious agro-ecological damages. Thus, it is necessary the search for new plant diseases control technologies. The objective of this study was to

evaluate the *in vitro* antimicrobial activity against *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* and the control of early blight and bacterial spot on tomato plants, using stable formulation, as soluble powder, from turmeric (*Curcuma longa*). To determine the shelf life, the soluble powder was kept at 40 °C during 0, 60, 120 and 180 days and assayed with five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹). When the shelf life and the best concentrations were defined, it was evaluated the time-interval of spraying of seven, 14 and 21 days. As control treatments were used the fungicides azoxystrobin (200 mg of active ingredient – a.i L⁻¹) to early blight and oxychloride (400 mg a.i. L⁻¹) to bacterial spot. There were no *in vitro* antifungal or antibacterial activities of the extracts. The calculated concentration of turmeric extract for the best control of diseases was 130 mg L⁻¹, with 24 months of shelf live to soluble powder. *In vivo*, the turmeric extract gave the same control of fungicides to early blight and bacterial spot, with values up to 74.58% of disease reduction, with spraying at seven days. These results show that aqueous extract obtained from turmeric soluble powder formulation, can protect tomato plants against early blight and bacterial spot.

Keywords: Agroecology, organic growth, alternative control, turmeric.

3. INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al. (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000) e a pinta preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & Martin) L.R. Jones & Grout (KUROZAWA & PAVAN, 2005), são doenças de ocorrência muito freqüentes e destrutivas na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), pois incidem em qualquer idade da planta e todos os órgãos da parte aérea são afetados, ocasionando elevados prejuízos econômicos.

A ocorrência dessas doenças no tomateiro exige cuidados extras, principalmente no caso de cultivo orgânico, em comparação com outras culturas mais resistentes, o que tem levado muitos agricultores a optarem pelo cultivo convencional, fortemente dependente do uso de defensivos químicos (POPIA et al., 2007).

Análises de resíduos de pesticidas indicam que em 18,27% das amostras de tomate analisadas havia presença de agrotóxicos acima do limite máximo permitido, como fentoato e permetrina, como também de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura, como aldicarbe (ANVISA, 2008).

Assim, face aos problemas que tem sido verificados pelo uso contínuo de pesticidas para o controle de doenças, como a seleção de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, poluição ambiental e intoxicações, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas e, uma das alternativas que tem demonstrado resultados promissores, é o uso de extratos vegetais com propriedades antimicrobiana direta e/ou de indução de resistência, a qual consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta hospedeira (STANGARLIN et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido feitas para identificar plantas cujo extrato apresente atividade biológica para controle de fitopatógenos (FIORI et al., 2000; BALBI-PEÑA et al., 2006a,b; FRANZENER et al., 2007; ITAKO et al., 2008; COLPAS et al., 2009; ITAKO et al., 2009; CARLOS et al., 2010; FORMIGHIERI et al., 2010). No entanto, ainda pouco se pesquisou sobre o uso de extratos da planta medicinal *Curcuma longa* (cúrcuma ou açafrão) para o controle de doenças em plantas.

Kuhn et al. (2008) verificaram que extratos de cúrcuma (10%) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) (10%) foram tão eficientes quanto os tratamentos controle com oxicloreto de cobre (4 g L^{-1}) e acibenzolar-S-metil (ASM - 50 mg L^{-1}) no controle de *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro híbrido “Débora Plus”, em condições de cultivo protegido.

Kuhn et al. (2006), estudando o efeito de *C. longa* em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, verificaram que *in vitro*, o extrato apresentou ação bactericida para concentrações que variaram de 10 a 20%, dependendo da procedência dos rizomas, mas, no entanto, *in vivo*, nas concentrações utilizadas, não houve efeito curativo em manivas de mandioca infectadas sistemicamente com o patógeno.

Balbi-Peña et al. (2006b) trabalharam com extrato de *C. longa* e solução de curcumina para controle de *A. solani* em tomateiro em cultivo protegido, utilizando como tratamentos controle ASM, um fungicida protetor (oxicloreto de cobre) e um fungicida sistêmico (azoxystrobin). Todos os tratamentos apresentaram valor de área abaixo da curva de progresso da doença estatisticamente menor do que a testemunha e o tratamento com curcumina 50 mg L^{-1} foi o único que apresentou menor porcentagem de frutos pequenos, e maior de frutos grandes.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e o controle no tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* utilizando formulações estáveis, obtidas a partir de extrato aquoso de cúrcuma, para determinar tempo de prateleira, intervalo de aplicação e dose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

Alternaria solani foi isolado a partir de lesões em folhas de tomateiro infectadas naturalmente, cultivado e mantido em meio V8 a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (BALBI-PEÑA et al., 2006a), e, para a esporulação, foi utilizada metodologia de Pulz & Massola Jr. (2009).

Para *Xanthomonas vesicatoria* foi utilizado o isolado 2010-24 proveniente de Caçador/SC e fornecido pela Embrapa - CNPH, o qual foi cultivado em meio ágar-nutriente a 25 °C e mantido no escuro por 72 h. A manutenção das bactérias ocorreu pelo método simples de armazenamento a -20 °C (MARIANO & ASSIS, 2000).

4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO

A partir de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) foi obtido um formulado pó solúvel, cujos detalhes metodológicos não são descritos em decorrência de processo de patenteamento. O pó solúvel obtido foi armazenado em embalagem de papel aluminizado impermeável (7 cm x 6,5 cm) contendo 1 g. Essas embalagens ou sachês foram submetidos ao processo de envelhecimento acelerado em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C por seis meses, ao que, não havendo alteração na atividade biológica do produto durante este tempo de armazenamento, atribui-se ao mesmo a validade de 24 meses (ANVISA, 2004).

Com zero, 60, 120 e 180 dias de armazenagem os sachês foram retirados e utilizados para avaliar a atividade biológica em ensaios *in vitro* (atividade antimicrobiana) e *in vivo* (controle de pinta preta e de mancha bacteriana no tomateiro). Para tanto, os formulados foram dissolvidos em água destilada esterilizada para obter concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, imediatamente antes do uso.

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para *A. solani* foi avaliada a germinação de conídios em lâmina de microscopia revestida com 800 µL de ágar-água 2% (STANGARLIN et al., 2010). Para tanto, alíquotas de 50 µL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados, e alíquotas de 50 µL de suspensão de esporos de *A. solani* (3x10⁴ conídios mL⁻¹), obtidos de uma cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz fluorescente durante 24 h a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada (BALBI-PEÑA et al., 2006a). Após 24 h foram adicionados 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos esporos. Foram utilizadas

três lâminas por tratamento. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento do seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

Para *X. vesicatoria*, 5 mL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados anteriormente, foram esterilizados em filtro de seringa (membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro) e adicionados assepticamente em tubo de ensaio com meio caldo nutriente. A concentração bacteriana foi acertada para todos os tratamentos em 4×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. A multiplicação bacteriana foi avaliada após 24 horas pela leitura de absorbância a 580 nm em espectrofotômetro.

Para estes ensaios foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial simples, considerando quatro tempos de armazenamento do pó solúvel (0, 60, 120 e 180 dias) e cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹), com três repetições, cujos dados foram submetidos à análise de variância (FERREIRA, 2003).

4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO

4.4.1. Avaliação da concentração do formulado

Sementes de tomateiro híbrido Débora-Plus (Sakata Seed Sudamerica Ltda.) foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido com substrato comercial e mantidas em casa de vegetação climatizada a 28 °C +/- 3 °C. Após 30 dias as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 L (uma planta por vaso) contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (2:1:2) autoclavados (1 h a 121 °C e 1 atm, sendo repetida a operação 24 h após). Vinte dias após o transplante as plantas foram aspergidas até o ponto de escorrimento com os formulados nas concentrações indicadas. Três dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas com *A. solani* (3×10^4 conídios mL⁻¹) ou *X. vesicatoria* (4×10^8 UFC mL⁻¹) e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. A severidade das doenças foi avaliada no 28º dia após a inoculação utilizando escalas diagramáticas (BALBI-PEÑA et al., 2006b; MELLO et al., 1997).

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial simples, considerando quatro tempos de armazenamento do formulado pó solúvel e cinco concentrações, com três repetições, sendo que estes dados foram submetidos a análise de variância e os dados ajustados em análise de regressão e comparados individualmente com os tratamentos controle pelo teste de Dunett a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado

Para determinar o melhor intervalo de aplicação do formulado de cúrcuma para controle de pinta preta e mancha bacteriana no tomateiro, foram utilizados os mesmos procedimentos já descritos, com a particularidade de que foi utilizada apenas uma concentração do formulado e um tempo de armazenamento, os quais apresentaram melhor controle dessas doenças pelo ensaio anterior. Foram testados intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, mantendo-se as inoculações do patógeno sempre aos três dias após os tratamentos. Mesmo para os intervalos de sete e 14 dias ocorreram inoculações dos patógenos todas as semanas para simular a ocorrência de epidemias. Dessa forma, no total foram cinco, três e duas aplicações de formulado de cúrcuma para os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, respectivamente, além de cinco inoculações dos patógenos em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu aos 35 dias após a primeira inoculação.

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando três intervalos de aplicação e uma concentração do formulado, além dos tratamentos controle negativo (com água) e positivos (com fungicidas), com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de cúrcuma e do tempo de armazenagem do formulado pó solúvel sobre a germinação de conídios de *A. solani* não foi significativa (Tabela 1). A média geral de conídios germinados foi de apenas 48,13%, indicando não haver com esse extrato solúvel atividade antimicrobiana direta sobre esse patógeno.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ² (mg L ⁻¹)	Dias ¹			
	0	60	120	180
0	50,00 ³	49,67	49,67	49,33
50	49,00	50,00	50,00	50,00
100	50,00	46,33	46,67	45,33
150	48,33	48,33	48,33	49,00
200	43,67	41,67	44,67	45,00
Média	48,13			
C.V. (%)	4,87			

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel.

³Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Resultados diferentes foram encontrados por outros autores. Balbi-Peña et al. (2006a) verificaram que o extrato aquoso de *C. longa* em concentrações de 10 e 15%, preparados no momento do uso, inibiram em 38 e 23% respectivamente o crescimento micelial, e em 72 e 87% respectivamente, a esporulação de *A. solani* isolado de tomateiro. Semelhantemente, o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* e de *Rhizoctonia solani* foi inibido em média em 61% pelo extrato aquoso de cúrcuma a 1% de concentração (AMARAL & BARA, 2005).

Semelhantemente, Saju et al. (1998) determinaram atividade fungistática *in vitro* do extrato de cúrcuma contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Sphaceloma cardamoni*, *Pestalotia palmarum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. Singh & Rai (2000) verificaram que o extrato de cúrcuma mostrou fungitoxidade *in vitro* contra *Fusarium udum* e Raja & Kurucheva (1998) obtiveram redução no crescimento *in vitro* de *Macrophomina phaseolina*.

Quanto à atividade antibacteriana contra *X. vesicatoria*, não se verificou efeito significativo para o tempo de armazenamento do pó solúvel e nem para a concentração do extrato aquoso de cúrcuma (Tabela 2). Verifica-se assim, que o extrato de cúrcuma nestes ensaios não mostrou atividade antimicrobiana contra *X. vesicatoria*.

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ² (mg L ⁻¹)	Dias ¹			
	0	60	120	180
50	0,700 ⁴	0,696	0,704	0,703
100	0,699	0,692	0,689	0,700
150	0,701	0,698	0,703	0,698
200	0,702	0,699	0,702	0,700
Controle ³	0,699	0,706	0,678	0,699
Média	0,698			
CV%	6,73			

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel;

³Caldo nutriente sem a presença de extrato de cúrcuma.

⁴Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Kuhn et al. (2006) avaliaram o controle *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *manihotis* mediante o uso de extrato aquoso de quatro genótipos de cúrcuma provenientes de cultivos de Jaboticabal-SP, Mara Rosa-GO, Maringá-PR e Mercedes-PR. O extrato de cúrcuma causou inibição completa do crescimento da bactéria na concentração de 10% para o material proveniente de Mercedes, enquanto que para a cúrcuma de Jaboticabal houve controle total a 15% e de Mara Rosa a 20%. A cúrcuma proveniente de Maringá não inibiu completamente o crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas.

Ainda com relação ao gênero *Xanthomonas*, Jabeen et al. (2011) observaram que a infusão obtida do rizoma de cúrcuma, em concentração de 1%, foi capaz de inibir o crescimento de *X. oryzae* pv. *oryzae*, com efeito semelhante ao do antibiótico estreptomina.

No entanto, deve-se ressaltar que tanto nesses trabalhos que mostraram efeito antibacteriano, quanto naqueles de efeito antifúngico, foram utilizadas concentrações de extrato de cúrcuma muito maiores que as desse trabalho, uma vez que apenas a concentração de 1% já equivale ao valor de 10.000 ppm ou mg L⁻¹. Portanto, as concentrações relativamente baixas utilizadas neste trabalho, associado à temperatura de aproximadamente 106 °C durante a obtenção do pó solúvel, podem ter contribuído para a perda da atividade antimicrobiana desses extratos.

5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração

Houve controle da pinta preta causada por *A. solani* em tomateiro tratado com extrato solúvel de cúrcuma, com a mesma eficiência do fungicida utilizado como tratamento padrão (Figura 1). Ao utilizar o extrato obtido de pó solúvel sem armazenamento (0) ou armazenado por 120 dias, houve redução linear da severidade da doença em relação à concentração, enquanto que para os demais tempos de armazenamento o efeito foi quadrático, mas mantendo-se a mesma eficiência, o que indica, portanto, validade ou tempo de prateleira desse produto de 24 meses na forma de pó solúvel. As concentrações a partir de 50 mg L⁻¹ para os tempos de 0, 60, 120 e 180 dias não diferindo do tratamento com fungicida. Para as equações quadráticas, a concentração calculada de extrato de cúrcuma que resultou em menor severidade da doença foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹. Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração.

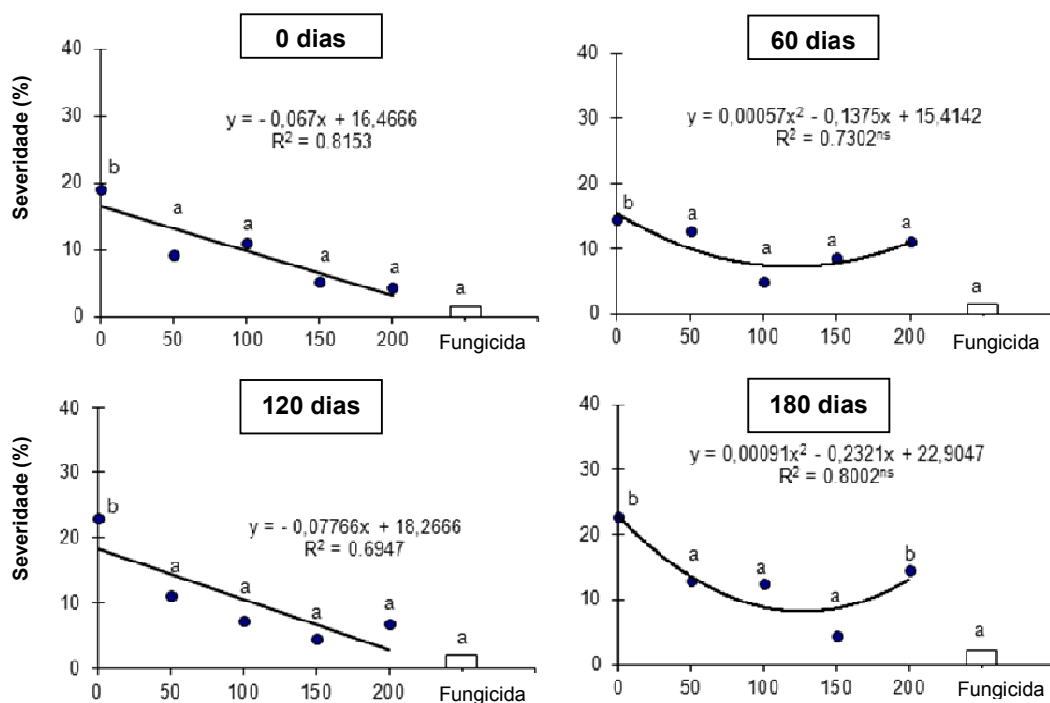


Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.

Para a mancha bacteriana, também houve controle desta doença pelo extrato aquoso de cúrcuma, com comportamento quadrático em relação às diferentes concentrações testadas (Figura 2). As concentrações de 100 a 150 mg L⁻¹ para os tempos 0 e 120 dias, 100 mg L⁻¹ para 60 dias e de 100 a 200 mg L⁻¹ para 180 dias de armazenamento do pó solúvel não diferiram do tratamento com fungicida. Dessa forma, como a eficiência do produto foi mantida mesmo para 180 dias de armazenamento, a validade ou tempo de prateleira do mesmo é de 24 meses na forma de pó solúvel. A concentração calculada de extrato de cúrcuma que resultou em menor severidade da doença também foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹. Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração.

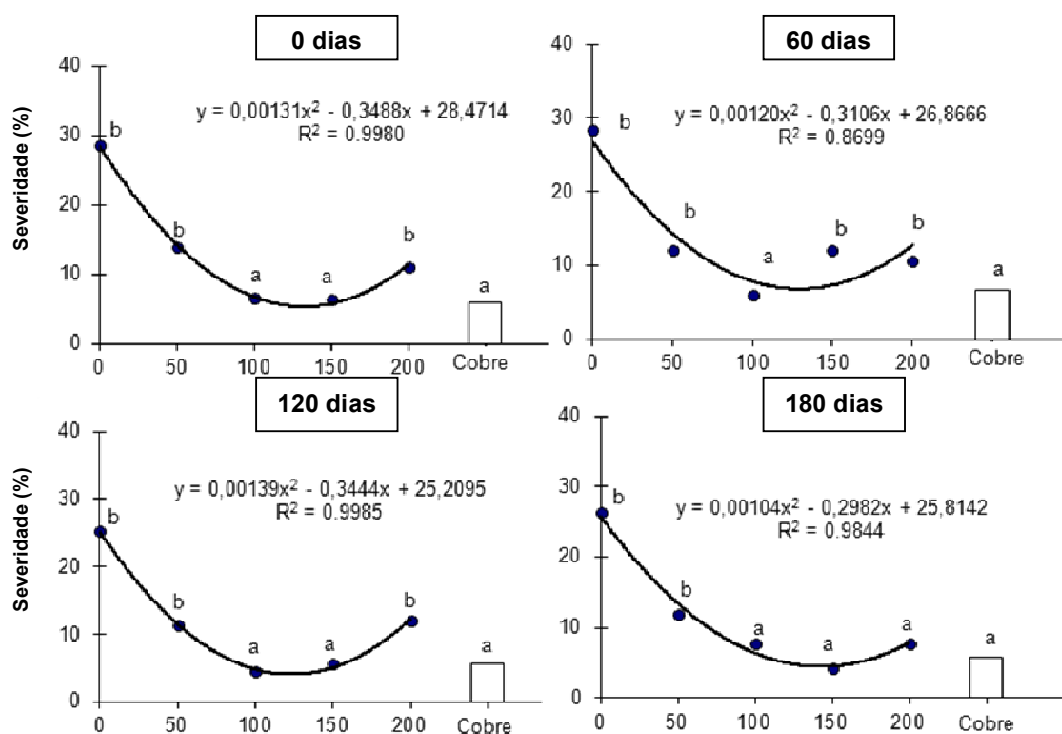


Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*), obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicloreto de cobre (400 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.

5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação

Houve controle de *A. solani* em plantas de tomateiro tratadas com extrato de cúrcuma (Tabela 3), com eficiência média de 57,70% em relação à testemunha água. O

melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (74,58% de controle). No entanto, o extrato de cúrcuma aplicado em intervalos de sete e 14 dias não diferiu do tratamento com fungicida.

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
Cúrcuma ¹	6,10 bC ³	9,30 bB	17,00 bA	57,70 ⁴
Fungicida ²	5,40 bB	7,80 bA	9,80 cA	69,96
Água	24,00 aB	25,40 aAB	27,20 aA	-
Média geral	14,50			
C.V. (%)	9,18			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Azoxystrobin (200 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 5%).

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

Para a mancha bacteriana (Tabela 4), a eficiência de controle proporcionada pelo extrato de cúrcuma foi de 56,24% em relação à testemunha água. O melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (74,14% de controle). No entanto, o extrato de cúrcuma aplicado em intervalos de sete e 14 dias não diferiu do tratamento com oxicleto de cobre.

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
Cúrcuma ¹	6,00 bC ³	9,40 bB	16,80 bA	56,24 ⁴
Oxicleto de cobre ²	5,00 bB	6,80 bAB	9,60 cA	70,92
Água	23,20 aB	23,60 aB	26,80 aA	-
Média geral	14,13			
C.V. (%)	12,85			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Oxicleto de cobre (400 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

O potencial de extratos obtidos de rizomas de cúrcuma para controle de doenças fúngicas tem sido verificado em outros trabalhos. Balbi-Peña et al. (2006b) trabalharam com extrato de *C. longa* e solução de curcumina para controle de *A. solani* em tomateiro em cultivo protegido, utilizando como tratamentos controle acibenzolar-S-metil (ASM – 125 mg i.a. L⁻¹), um fungicida protetor (oxiclureto de cobre – 1100 mg i.a. L⁻¹) e um fungicida sistêmico (azoxystrobin – 80 mg i.a. L⁻¹). Todos os tratamentos apresentaram valor de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) estatisticamente menor do que a testemunha. Dentre os mesmos, o tratamento com ASM foi o menos eficiente, mas não diferindo estatisticamente de cúrcuma 10% e curcumina 100 mg L⁻¹. Cúrcuma 1%, curcumina 50 mg L⁻¹ e oxiclureto de cobre apresentaram melhor nível de controle, mas ainda inferior estatisticamente ao obtido pelo fungicida azoxystrobin. Não houve diferenças estatísticas na produção e no número de frutos comerciais, nem na massa fresca média de frutos entre tratamentos. Quanto ao tamanho dos frutos, o tratamento de curcumina 50 mg L⁻¹ foi o único que apresentou menor porcentagem de frutos pequenos e maior de frutos grandes em relação à testemunha. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à porcentagem de frutos de tamanho médio.

Outro trabalho é o de Becker et al. (2004), com extratos de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *C. longa* e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) para controle de doenças de final de ciclo (*Septoria glycines* e *Cercospora kikuchii*) e oídio (*Microsphaera diffusa*) em soja em condições de campo. O tratamento com curcumina a 50 mg L⁻¹ proporcionou peso total de sementes de soja 29% maior que o obtido com o tratamento padrão com o fungicida pyraclostrobin + epoxiconazole (0,6 L p.c. ha⁻¹). Extratos de *C. citratus* e *C. longa* a 5% proporcionaram o mesmo nível de controle de DFC que o fungicida utilizado para comparação. *C. citratus* e *R. officinalis* a 5% e *C. longa* a 5 e 10% foram tão eficientes quanto o fungicida no controle de oídio. O extrato de *C. longa* a 10%, além do eficiente controle de DFC e oídio em soja, permitiu obter uma produtividade 16% maior (equivalente a 535 kg a mais por ha) em relação ao tratamento com o fungicida.

Embora neste trabalho o extrato de cúrcuma tenha sido eficiente para controle da mancha bacteriana no tomateiro, Kuhn et al. (2006) não observaram a mesma eficiência. Esses autores verificaram que em manivas de mandioca tratadas com extrato de cúrcuma de diferentes procedências, os valores de brotamento das plantas foram baixos, devido ao grau de infecção das manivas, e que o extrato a 10% proveniente de Mercedes foi

prejudicial para a mandioca em condição de campo, reduzindo o estande em relação aos tratamentos controle. Possivelmente houve ação tóxica direta sobre a fisiologia da planta ou indução de suscetibilidade. Já na concentração de 1% da cúrcuma proveniente de Maringá, não houve diferença estatística em relação às testemunhas para o parâmetro estande de plantas. Com relação à severidade e produtividade não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Em trabalhos com outras plantas da família Zingiberaceae, como é o caso do gengibre (*Zingiber officinale*), tem sido verificado o mesmo potencial para controle de fitopatógenos que a cúrcuma, também uma zingiberácea. Rodrigues et al. (1999) avaliaram o potencial fungitóxico do gengibre em *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum graminicola*. *in vitro*, verificaram a inibição do crescimento micelial dos fungos pelos extratos brutos nas concentrações acima de 5% e pelos óleos essenciais nas alíquotas acima de 20 µL. Em casa de vegetação, estudaram o efeito da irrigação do extrato bruto (caldo), água aromatizada e adição de resíduo sobre a emergência, altura das plantas e pesos úmido e seco de parte aérea e raiz de feijoeiro plantado em solo infestado com *S. rolfsii*. A irrigação com caldo e a cobertura morta proporcionaram plântulas com altura e pesos superiores à testemunha.

Rodrigues et al. (2007) estudaram o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em alface por extratos aquosos de gengibre nas concentrações de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25%, e também pela massa de gengibre aplicada na base das plantas. Os resultados indicaram o potencial desses tratamentos para controle da doença, o que pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação de mecanismos de defesa da alface.

Silva & Bach (2004) analisaram a possibilidade de indução de resistência como método de controle de *Bipolaris sorokiniana* utilizando extrato de gengibre em plantas de cevada, relacionando com concentração de proteínas β -1,3-glucanase. A porcentagem de proteção foi acima de 90% tendo aumento em função do tempo (21, 48 e 72 h) entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno. Nas análises bioquímicas dos extratos foliares dos referidos tratamentos, observou-se aumento na quantidade de proteína total da mesma forma que houve aumento na atividade da enzima β -1,3-glucanase.

Neste trabalho, o controle da pinta preta e da mancha bacteriana proporcionada pelos extratos aquosos obtidos da formulação do pó solúvel de cúrcuma, associado à ausência de atividade antimicrobiana direta sobre *A. solani*, indicam que o provável mecanismo envolvido nesta proteção seja a indução de resistência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v. 2, Suplemento, p.5-8, 2005.

ANVISA. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br.

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. 2008. Disponível em www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.311-315, 2006a.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p.401-404, 2006b.

BECKER, A.; VIGO-SCHULTZ, S.C.; STANGARLIN, J.R.; BALBI-PEÑA, M.I.; KLAHOLD, C.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. 2004. Controle alternativo das doenças de final de ciclo e oídio na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29 (supl.), p.163, 2004.

CARLOS, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; ITAKO, A.T.; BONALDO, S.M.; MESQUINI, R.M.; CARVALHO, J.B.; STANGARLIN, J.R. Efeito de extrato bruto e óleo essencial de *Achillea millefolium* em desenvolvimento *in vitro* de *Corynespora cassicola* e proteção de pepino à mancha de corinespora. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 309-316, 2010.

COLPAS, F.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FERRARESE, M.L.; SCAPIM, C.A.; BONALDO, S.M. Induction of plant defense responses by *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) leaf extracts. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 191-195, 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar versão 5.3**. DEX/UFLA. 2003.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 483-487, 2000.

FORMIGHIERI, A.P.; STANGARLIN, J.R.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Avaliação do potencial da planta *Adiantum capillus-veneris* (L.) no controle de fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 487-496, 2010.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 27-36, 2007.

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

ITAKO, A.T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TOLENTINO JR., J.B.; CRUZ, M.E.S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 75-83, 2009.

JABEEN, R.; ASHRAF, M.; AHMAD, I.; IFTIKHAR, T. Purification and bioassays of bioactive fraction from *Curcuma longa* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing BLB disease in rice. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, n.2, p.1335-1342, 2011.

KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R.; BALDO, M.; IURKIV.; MEINERZ, C.; FRANZENER, G.; TRAUTMANN, R.R. Resistência induzida contra *Xanthomonas vesicatoria* afeta o metabolismo produtivo do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34 (supl.), p. 35, 2008.

KUHN, O.J.; PORTZ, R.L.; STANGARLIN, J.R.; MONTALVÁN, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

KUROZAWA, C; PAVAN, A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. V.2, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. p.690-719, 2005.

LOPES, C.A; QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOMIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Vol. 2. Viçosa: os editores. 2000. p.757-800.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 37-47.

MELLO, S.C.M., TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.447-448, 1997.

POPIA, A.F.; CIDADE JÚNIOR, H.A.; HAMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; ASSIS, O. **Manual de olericultura orgânica**. Curitiba: EMATER/SEAB, 2007. 128 p.

PULZ, P.; MASSOLA JR., N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.121-126, 2009

RAJA, J.; KURUCHEVE, V. Influence of plants extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**, v.51, n.1, p.102-103, 1998.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; BERNARDO, R.; STANGARLIN, J.R. Potencial de *Zingiber officinale* (gengibre) no controle de fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, (supl.), p.321, 1999.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v33, p.20-24, 2007.

SAJU, K.A., VENUGOPAL, M.N.; MATHEW, M.J. Antifungal and insect-repellent activities of essential oil of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Current Science**, v.75, n.7, p.660-662, 1998.

SILVA, A.A.O.; BACH, E.E. Indução de resistência em plantas de cevada contra *Bipolaris sorokiniana* utilizando extrato de gengibre. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.111-114, 2004.

SINGH, R.; RAI, B. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios**, v.102, p.165-173, 2000.

STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Estratégias de seleção e uso de extratos de plantas no controle microbiano *in vitro*. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Org.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ª ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v. 1, p. 293-345.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. p.1033-1042.

CAPÍTULO III

EXTRATO FORMULADO DE *Pycnoporus sanguineus* PARA CONTROLE DE *Alternaria solani* E DE *Xanthomonas vesicatoria* EM TOMATEIRO: TEMPO DE PRATELEIRA, CONCENTRAÇÃO E INTERVALO DE APLICAÇÃO

1. RESUMO

Face aos problemas de contaminação ambiental e danos em organismos não alvos resultantes do uso indiscriminado de agrotóxicos, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas contra as doenças. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria* e o controle da pinta preta e da mancha bacteriana no tomateiro, utilizando para tanto, produto formulado estável, na forma de pó solúvel, de basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus*. Para o teste de estabilidade, o pó solúvel foi armazenado a 40 °C por 0, 60, 120 e 180 dias e testado em cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). Definidos o tempo de prateleira e a melhor concentração, avaliaram-se os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. Não houve *in vitro* atividade antifúngica a antibacteriana dos extratos. A concentração calculada de extrato de *P. sanguineus* que resultou em menor severidade das doenças foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹, com tempo de prateleira do pó solúvel de 24 meses. *In vivo*, os extratos proporcionaram o mesmo nível de controle da pinta preta e da mancha bacteriana que os fungicidas utilizados, com eficiência de até 79,31%, em intervalo de aplicação de sete dias. Estes resultados demonstram a eficiência do controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro, provavelmente por indução de resistência, pelo extrato aquoso obtido de formulação pó solúvel de *P. sanguineus*.

Palavras-chave: Agroecologia, agricultura orgânica, controle alternativo, Basidiomycota.

2. ABSTRACT

***Pycnoporus sanguineus* formulated extract to the control of *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato: shelf life, concentration and time of spraying**

Due the environmental pollution and damages in non-target organisms, by the indiscriminate use of pesticides in agriculture, it is necessary the search for new plant diseases control technology. The objective of this study was to evaluate the *in vitro*

antimicrobial activity against *Alternaria solani* and *Xanthomonas vesicatoria* and the control of early blight and bacterial spot on tomato plants, using stable formulation, as soluble powder, from *Pycnopus sanguineus* fruiting body. To determine the shelf life, the soluble powder was kept at 40 °C during 0, 60, 120 and 180 days and assayed with five concentrations (0, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹). When the shelf life and the best concentrations were defined, it was evaluated the time-interval of spraying of seven, 14 and 21 days. As control treatments were used the fungicides azoxystrobin (200 mg of active ingredient – a.i L⁻¹) to early blight and oxychloride (400 mg a.i. L⁻¹) to bacterial spot. There were no *in vitro* antifungal and antibacterial activities from extracts. The calculated concentration of *P. sanguineus* extract for the best control of diseases was 130 mg L⁻¹, with 24 months of shelf live to soluble powder. *In vivo*, the *P. sanguineus* extract gave the same control of fungicides to early blight and bacterial spot, with values up to 79,31% of disease reduction, with spraying at seven days. These results show that the aqueous extract obtained from *P. sanguineus* soluble powder formulation, can protect tomato plants against early blight and bacterial spot, probably by resistance induction.

Keywords: Agroecology, organic growth, alternative control, Basidiomycota.

3. INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é suscetível a grande número de doenças, como a mancha bacteriana e a pinta preta. A mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al. é uma doença de ocorrência muito frequente e destrutiva em condições de elevada umidade, precipitação e temperaturas, sendo o tomateiro suscetível em qualquer idade e todos os órgãos da parte aérea são afetados (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000). A pinta preta, causada por *Alternaria solani* (Ellis & Martin) L.R. Jones & Grout, também é uma das mais importantes e freqüentes doenças da cultura, com alto potencial destrutivo e incidindo sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos, ocasionando elevados prejuízos econômicos (KUROZAWA & PAVAN, 2005). A ocorrência dessas doenças no tomateiro exige cuidados extras, principalmente no caso de cultivo orgânico, em comparação com outras culturas mais resistentes, o que tem levado muitos agricultores a optarem pelo cultivo convencional, fortemente dependente do uso de defensivos químicos (POPIA et al., 2007).

Análises de resíduos de pesticidas indicam que em 18,27% das amostras de tomate analisadas havia presença de agrotóxicos acima do limite máximo permitido, como

fentoato e permetrina, como também de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura, como aldicarbe (ANVISA, 2008).

Assim, face aos problemas que tem sido verificados pelo uso contínuo de pesticidas para o controle de doenças, como a seleção de isolados dos patógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas, poluição ambiental e intoxicações, têm-se buscado novas medidas de proteção das plantas. Uma das alternativas que tem demonstrado resultados promissores, é o uso de agentes bióticos e abióticos com propriedades antimicrobiana direta e/ou de indução de resistência, a qual consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na própria planta hospedeira (STANGARLIN et al., 2011). Dentre os diversos agentes, utilizados em trabalhos de indução de resistência de plantas a patógenos, os basidiomicetos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* vêm se destacando (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004; DI PIERO et al., 2006; FIORI-TUTIDA et al., 2007).

Porém, extratos de outras espécies fúngicas vêm sendo estudados para esse fim, como é o caso de *Pycnoporus sanguineus*, que tem demonstrado potencial na indução de resistência para o controle de diversas doenças de plantas.

Assi (2005), estudando o efeito da aplicação de extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* contra *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro, concluiu que houve o controle da antracnose e que o mesmo pode ocorrer tanto por atividade antimicrobiana direta, através da inibição da germinação de conídios do patógeno, quanto por indução de resistência local e sistêmica, através da ativação de peroxidases. Baldo et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes para o mesmo patossistema, observando ainda a capacidade de indução de fenilalanina amônia-liase, β -1,3 glucanase e de espécies reativas de oxigênio.

Viecelli et al. (2009 e 2010), estudando o efeito da aplicação de extratos de *P. sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola* em feijoeiro, concluíram que os extratos controlam a mancha angular através de atividade antimicrobiana sobre o patógeno e indução de peroxidases e polifenoloxidasas, de forma localizada e sistêmica.

Toillier et al. (2010) verificaram as atividades antibacteriana e indutora de resistência de extratos de *P. sanguineus* para controle do crestamento bacteriano comum em feijoeiro, utilizando extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura deste fungo. Foi observada atividade antibacteriana contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* apenas para o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e para o extrato de basidiocarpo em todas as concentrações avaliadas. *In vivo*, os resultados indicaram o potencial de extratos de basidiocarpos para o controle desta doença em feijoeiro, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto por indução de

resistência envolvendo a ativação das enzimas de defesa vegetal peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* e o controle no tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* utilizando formulações estáveis, obtidas a partir de extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus*, para determinar tempo de prateleira, intervalo de aplicação e dose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS PATÓGENOS

Alternaria solani foi isolado a partir de lesões em folhas de tomateiro infectadas naturalmente, cultivado e mantido em meio V8 a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (BALBI-PEÑA et al., 2006a), e, para a esporulação, foi utilizada metodologia de Pulz & Massola Jr. (2009).

Para *Xanthomonas vesicatoria* foi utilizado o isolado 2010-24 proveniente de Caçador/SC e fornecido pela Embrapa - CNPH, o qual foi cultivado em meio ágar-nutriente a 25 °C e mantido no escuro por 72 h. A manutenção das bactérias ocorreu pelo método simples de armazenamento a -20 °C (MARIANO & ASSIS, 2000).

4.2. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO FORMULADO

A partir de extrato aquoso de *P. sanguineus* foi obtido um formulado pó solúvel, cujos detalhes metodológicos não são descritos em decorrência de processo de patenteamento. O pó solúvel obtido foi armazenado em embalagem de papel aluminizado impermeável (7 cm x 6,5 cm) contendo 1 g. Essas embalagens ou sachês foram submetidos ao processo de envelhecimento acelerado em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C por seis meses, ao que, não havendo alteração na atividade biológica do produto durante este tempo de armazenamento, atribui-se ao mesmo a validade de 24 meses (ANVISA, 2004).

Com zero, 60, 120 e 180 dias de armazenagem os sachês foram retirados e utilizados para avaliar a atividade biológica em ensaios *in vitro* (atividade antimicrobiana) e *in vivo* (controle de pinta preta e de mancha bacteriana no tomateiro). Para tanto, os formulados foram dissolvidos em água destilada esterilizada para obter concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹, imediatamente antes do uso.

4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para *A. solani* foi avaliada a germinação de conídios em lâmina de microscopia revestida com 800 µL de ágar-água 2% (STANGARLIN et al., 2010). Para tanto, alíquotas

de 50 µL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados, e alíquotas de 50 µL de suspensão de esporos de *A. solani* (3×10^4 conídios mL⁻¹), obtidos de uma cultura com 14 dias de idade, foram distribuídas na superfície das lâminas. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz fluorescente durante 24 h a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como testemunha foi utilizada água destilada esterilizada (BALBI-PEÑA et al., 2006a). Após 24 h foram adicionados 40 µL de lactofenol com azul de algodão em cada lâmina, a fim de paralisar a germinação dos esporos. Foram utilizadas três lâminas por tratamento. O esporo foi considerado germinado quando o comprimento do seu tubo germinativo era maior ou igual ao menor diâmetro do esporo.

Para *X. vesicatoria*, 5 mL dos formulados, com concentrações corrigidas para se manter os valores indicados anteriormente, foram esterilizados em filtro de seringa (membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro) e adicionados assepticamente em tubo de ensaio com meio caldo nutriente. A concentração bacteriana foi acertada para todos os tratamentos em 4×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. A multiplicação bacteriana foi avaliada após 24 horas pela leitura de absorbância a 580 nm em espectrofotômetro.

Para estes ensaios foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial simples, considerando quatro tempos de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias) e cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹), com três repetições, cujos dados foram submetidos à análise de variância pelo programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

4.4. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA NO TOMATEIRO

4.4.1. Avaliação da concentração do formulado

Sementes de tomateiro híbrido Débora-Plus (Sakata Seed Sudamerica Ltda.) foram semeadas em bandejas de poliestireno expandido com substrato comercial e mantidas em casa de vegetação climatizada a 28 °C +/- 3 °C. Após 30 dias as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 L (uma planta por vaso) contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (2:1:2) autoclavados (1 h a 121 °C e 1 atm, sendo repetida a operação 24 h após). Vinte dias após o transplante as plantas foram aspergidas até o ponto de escorrimento com os formulados nas concentrações indicadas. Três dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas com *A. solani* (3×10^4 conídios mL⁻¹) ou *X. vesicatoria* (4×10^8 UFC mL⁻¹) e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Como tratamentos controle foram utilizados os fungicidas azoxystrobin (200 mg do ingrediente ativo – i.a. L⁻¹) para a pinta preta e oxicloreto de cobre (400 mg i.a. L⁻¹) para a mancha bacteriana. A severidade das

doenças foi avaliada no 28º dia após a inoculação utilizando escalas diagramáticas (BALBI-PENNA et al., 2006b; MELLO et al., 1997).

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando quatro tempos de armazenamento do formulado, cinco concentrações, com três repetições, sendo que estes dados foram submetidos a análise de variância e os dados ajustados em análise de regressão e comparados individualmente com os tratamentos controle pelo teste de Dunnett a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

4.4.2. Avaliação do intervalo de aplicação do formulado

Para determinar o melhor intervalo de aplicação do formulado de *P. sanguineus* para controle de pinta preta e mancha bacteriana no tomateiro, foram utilizados os mesmos procedimentos já descritos, com a particularidade de que foi utilizada apenas uma concentração do formulado e um tempo de armazenamento, os quais apresentaram melhor controle dessas doenças pelo ensaio anterior. Foram testados intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, mantendo-se as inoculações do patógeno sempre aos três dias após os tratamentos. Mesmo para os intervalos de sete e 14 dias ocorreram inoculações dos patógenos todas as semanas para simular a ocorrência de epidemias. Dessa forma, no total foram cinco, três e duas aplicações de formulado de *P. sanguineus* para os intervalos de aplicação de sete, 14 e 21 dias, respectivamente, além de cinco inoculações dos patógenos em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu aos 35 dias após a primeira inoculação.

Para estas avaliações foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando três intervalos de aplicação e uma concentração do formulado, além dos tratamentos controle negativo (com água) e positivos (com fungicidas), com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A análise de variância do efeito das concentrações do extrato de *P. sanguineus* e do tempo de armazenagem do formulado pó solúvel sobre a germinação de conídios de *A. solani* não foi significativa (Tabela 1). A média geral de conídios germinados foi de apenas 48,42% e não houve atividade antimicrobiana direta sobre esse patógeno.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de conídios de *A. solani* na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. sanguineus* obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ² (mg L ⁻¹)	Dias ¹			
	0	60	120	180
0	50,00 ³	49,67	49,33	49,67
50	47,00	49,00	49,00	49,00
100	48,33	50,00	50,00	49,33
150	46,67	50,00	50,00	50,00
200	43,67	41,67	44,67	45,00
Média		48,42		
C.V. (%)		4,69		

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel.

³Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Resultados indicando a presença de atividade antimicrobiana de extratos de *P. sanguineus* tem sido, no entanto, verificadas em outros trabalhos. Baldo et al. (2008) observaram que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações 5, 10, 15 e 20% inibiram significativamente a germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus* e *Phakopsora euvitis*, sendo que o extrato a 5% inibiu em 78,8% a germinação de *P. euvitis* e a 20% inibiu em 72,9% a germinação de *U. appendiculatus* em relação a testemunha água.

Contra *Colletotrichum lindemuthianum*, Baldo (2008) verificou que extratos aquosos de basidiocarpos de *P. sanguineus* nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% inibiram a germinação dos conídios em até 97%, enquanto que para o extrato de micélio de *P. sanguineus*, a inibição foi de até 40%.

Viecelli et al. (2010) verificaram que a germinação de esporos de *Pseudocercospora griseola* (mancha angular do feijoeiro) foi reduzida em até 70% na concentração de 20% do extrato aquoso obtido do micélio de *P. sanguineus*. Essa mesma concentração reduziu totalmente o crescimento micelial do patógeno e a esporulação foi reduzida em 100% a partir da concentração 5% do extrato aquoso. No entanto, concentrações de 1 a 20% do filtrado de cultura de *P. sanguineus* não inibiram a germinação de esporos, o crescimento micelial e a esporulação desse patógeno (VIECELLI et al., 2009).

Quanto à atividade antibacteriana contra *X. vesicatoria*, também não se verificou efeito significativo para o tempo de armazenamento do pó solúvel e nem para a concentração do extrato aquoso de *P. sanguineus* (Tabela 2). Verifica-se assim, que o extrato de *P. sanguineus* nestes ensaios não mostrou atividade antimicrobiana contra *X. vesicatoria*.

Tabela 2. Multiplicação de *X. vesicatoria* (medida em absorbância a 580 nm) na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. sanguineus* obtido de formulado pó solúvel armazenado por diferentes períodos.

Concentração do extrato ² (mg L ⁻¹)	Dias ¹			
	0	60	120	180
50	0,702 ⁴	0,701	0,704	0,700
100	0,701	0,702	0,701	0,700
150	0,707	0,703	0,701	0,705
200	0,701	0,696	0,705	0,698
Controle ³	0,699	0,706	0,678	0,699
Média	0,700			
CV%	7,534			

¹Teste de envelhecimento acelerado do pó solúvel, armazenado a 40 °C por diferentes períodos;

²Extratos aquosos obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel;

³Caldo nutriente sem a presença de extrato de *P. sanguineus*.

⁴Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Toillier et al. (2010) verificaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos de basidiocarpo, micélio e filtrado de cultura *P. sanguineus* contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, causadora do cretamento bacteriano comum em feijoeiro. Esses pesquisadores observaram que apenas o filtrado de cultura em concentrações acima de 15% e o extrato de basidiocarpo em todas as concentrações avaliadas (1, 5, 10, 15 e 20%) inibiram a multiplicação bacteriana, diferentemente do encontrado neste trabalho. No entanto, deve-se levar em consideração que mesmo a maior concentração aqui utilizada (200 mg L⁻¹) é 50 vezes inferior a menor concentração utilizada naquele trabalho, que foi de 1%, o que pode explicar, assim, a ausência de atividade antimicrobiana direta.

5.2. CONTROLE DE PINTA PRETA E MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO

5.2.1. Avaliação do tempo de armazenamento do pó solúvel e da concentração

Houve controle da pinta preta causada por *A. solani* em tomateiro tratado com extrato solúvel de *P. sanguineus*, com a mesma eficiência do fungicida utilizado como

tratamento padrão (Figura 1). Ao utilizar o extrato obtido de pó solúvel houve redução na severidade da doença de forma dependente da concentração, em todos os tempos de armazenamento, o efeito foi quadrático, mantendo-se a mesma eficiência, o que indica, portanto, validade ou tempo de prateleira desse produto de 24 meses na forma de pó solúvel. As concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ para os tempos 0 e 60 dias, e de 100 e 150 mg L⁻¹ para os tempos 120 e 180, dias não diferiram do tratamento com fungicida. Para as equações quadráticas, a concentração calculada de extrato de *P. sanguineus* que resultou em menor severidade da doença foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹. Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração. Para bactérias não fitopatogênicas, outros trabalhos também indicam a atividade antimicrobiana de *P. sanguineus*, conforme demonstrado por Smânia et al. (1995 e 1998).

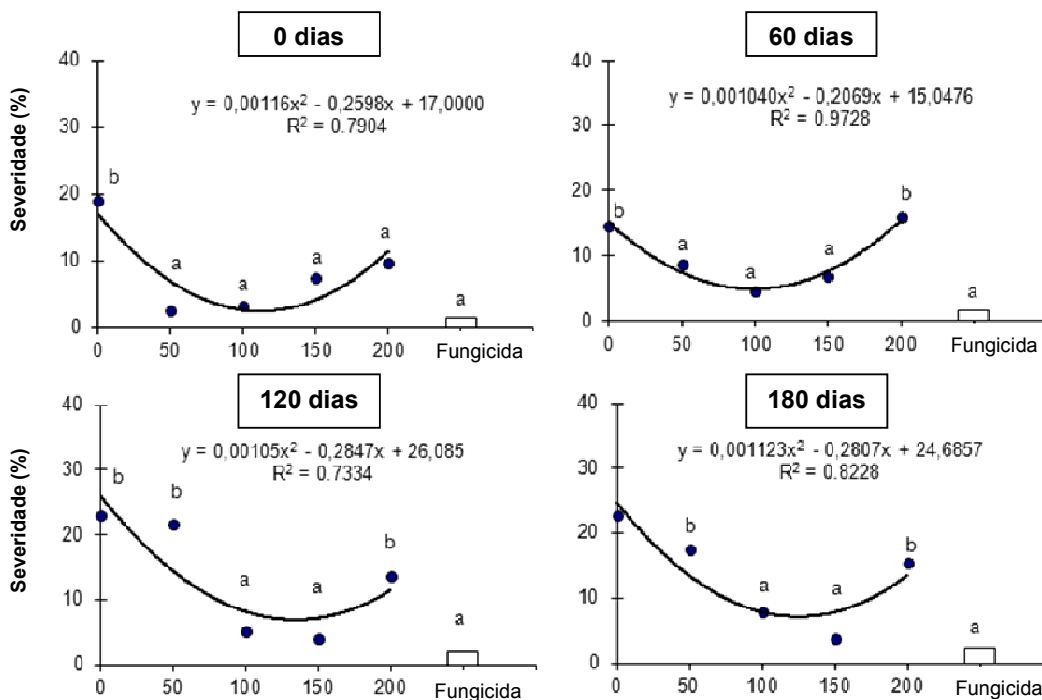


Figura 1 – Severidade da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de *P. sanguineus*, obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Fungicida: azoxystrobin (200 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.

Para a mancha bacteriana, também houve controle desta doença pelo extrato aquoso de *P. sanguineus*, com comportamento quadrático em relação às diferentes concentrações testadas (Figura 2). A concentração de 150 mg L⁻¹ para os tempos zero e 120 dias, e de 50 e 150 mg L⁻¹ para os tempos 60 e 180 dias de armazenamento do pó solúvel não diferiram

do tratamento com fungicida. Dessa forma, como a eficiência do produto foi mantida, a validade ou tempo de prateleira do mesmo é de 24 meses na forma de pó solúvel. A concentração calculada de extrato de *P. sanguineus* que resultou em menor severidade da doença também foi em média ao redor de 130 mg L⁻¹. Assim, para os demais ensaios, como intervalo de aplicação, optou-se por utilizar esta concentração.

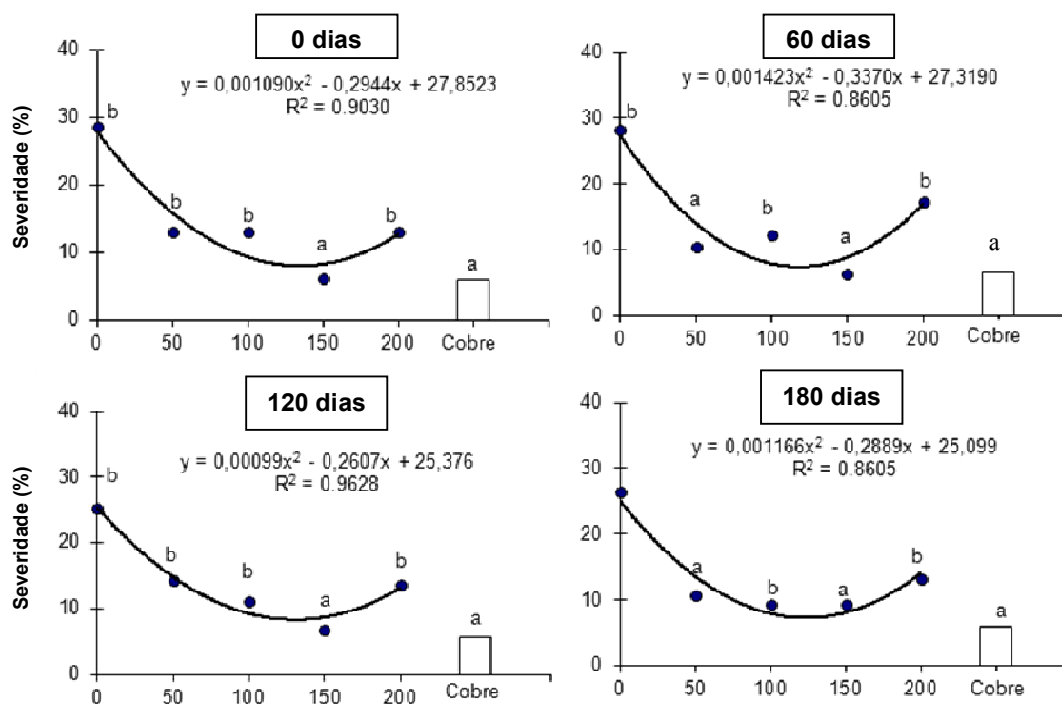


Figura 2 – Severidade da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro tratado com diferentes concentrações (mg L⁻¹) de extrato aquoso de *P. sanguineus*, obtido de formulado pó solúvel armazenado por zero, 60, 120 ou 180 dias a 40 °C. Cobre: fungicida oxicleto de cobre (400 mg L⁻¹). Médias com letras distintas indicam diferença estatística (Dunett ≤ 5%) em relação ao tratamento fungicida.

5.2.2. Avaliação do intervalo de aplicação

Houve controle de *A. solani* em plantas de tomateiro tratadas com extrato de *P. sanguineus* (Tabela 3), com eficiência média de 57,96% em relação à testemunha água. O melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (70,41% de controle). No entanto, o extrato de *P. sanguineus* aplicado em intervalos de sete e 14 dias não diferiu do tratamento com fungicida.

Tabela 3. Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de *P. sanguineus* na severidade (%) da pinta preta, causada por *A. solani*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
<i>P. sanguineus</i> ¹	7,10 bC ³	9,50 bB	15,60 bA	57,96 ⁴
Fungicida ²	5,40 bB	7,80 bAB	9,80 cA	69,96
Água	24,00 aB	25,40 aAB	27,20 aA	-
Média geral	14,64			
C.V. (%)	10,77			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Azoxystrobin (200 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

Para a mancha bacteriana (Tabela 4), a eficiência de controle proporcionada pelo extrato de *P. sanguineus* foi de 58,15% em relação à testemunha água. O melhor controle foi obtido quando o extrato foi aplicado em intervalo de sete dias (79,31% de controle). No entanto, o extrato de *P. sanguineus* aplicado em intervalo de sete dias não diferiu do tratamento com oxicleto de cobre.

Tabela 4 Efeito do intervalo de aplicação do extrato aquoso de *P. sanguineus* na severidade (%) da mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, em tomateiro.

Tratamentos	Intervalo (dias)			Controle (%)
	7	14	21	
<i>P. sanguineus</i> ¹	4,80 bC ³	10,60 bB	15,40 bA	58,15 ⁴
Oxicleto de cobre ²	5,00 bB	6,80 cAB	9,60 cA	70,92
Água	23,20 aB	23,60 aB	26,80 aA	-
Média geral	13,97			
C.V. (%)	14,70			

¹Extratos aquosos (130 mg L⁻¹) obtidos no momento do uso a partir do pó solúvel armazenado por 180 dias;

²Oxicleto de cobre (400 mg L⁻¹);

³O patógeno foi inoculado semanalmente em todas as plantas. A avaliação de severidade ocorreu 35 dias após a primeira inoculação. Médias seguidas de mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

⁴Considerando a média dos três intervalos de aplicação.

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial de controle de doenças em plantas por extratos derivados de *P. sanguineus*. Assi (2005) verificou que o extrato aquoso de basidiocarpos de *P. sanguineus* a 20% controlou a antracnose, com redução de 70% na

severidade na 7ª folha (tratada e inoculada), enquanto que para o fungicida (azoxystrobin) a redução foi de 73%. Para a 8ª folha (apenas inoculada), os extratos a 5, 10 e 20% reduziram a severidade em 58, 64 e 68%, respectivamente, enquanto que para o fungicida a redução foi de 74%. O controle da ferrugem asiática em soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, foi estudado por Iurkiv (2008) utilizando as frações protéicas III (3,44 kda), IV (2,79 kda) e V (1,82 kda), obtidas por cromatografia de filtração em gel, a partir do extrato aquoso de basidiocarpo de *P. sanguineus*. Essas frações não inibiram *in vitro* a germinação dos uredósporos, mas a fração III reduziu o número de pústulas por cm² de folha, o que envolveu incremento local e sistêmico na atividade de β -1,3 glucanase.

Viecelli et al. (2009) utilizaram extratos aquosos de filtrado de cultura de *Pycnopus sanguineus* para controle da mancha angular causada por *Pseudocercospora griseola* no feijoeiro, em concentrações de 10 e 20%, e verificaram que a severidade foi reduzida em 82% e 49% em casa de vegetação e a campo respectivamente, provavelmente por indução de resistência envolvendo alteração na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. Ainda neste mesmo patossistema, Viecelli et al. (2010), nesta vez utilizando extrato aquoso obtido de micélio de *P. sanguineus*, reduziram a severidade em 93% e 50% em casa de vegetação e a campo respectivamente, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antimicrobiana direta quanto pela ativação dessas enzimas.

Toillier et al. (2010), utilizando extrato aquoso de micélio, basidiocarpo e filtrado de cultura de *P. sanguineus* a 5% e 10%, verificaram o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, o que pode ter ocorrido tanto por atividade antibacteriana, quanto por indução de resistência envolvendo a ativação das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase e fenilalanina amônia-liase.

Baldo et al. (2011), com o objetivo detectar *in situ* a formação de espécies reativas de oxigênio, particularmente peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical superóxido (O₂⁻), em plantas de feijão, utilizaram extrato aquoso de micélio e de basidiocarpo de *P. sanguineus* a 5%. Foi detectada formação de H₂O₂ em 48 horas após a inoculação (hai) apenas para o tratamento com extrato de basidiocarpo. Para O₂⁻, foi detectada a formação principalmente para o tratamento com extrato de micélio em 48 hai. Em 192 hai todos os tratamentos apresentaram reação para H₂O₂ e O₂⁻ nas células epidérmicas e do mesófilo, provavelmente em decorrência do processo infeccioso.

A ativação de mecanismos de defesa em plantas tratadas com extratos derivados de *P. sanguineus* também foi verificada por Peiter-Beninca et al. (2008), que testaram os extratos diclorometânico, hexânico e etanólico obtidos de basidiocarpos de *P. sanguineus*, em concentrações de 100, 250, 500 e 750 mg L⁻¹ em relação à indução de fitoalexinas em

cotilédones de soja e mesocótilos estiolados de sorgo. Para sorgo, o extrato hexânico (750 mg L⁻¹) proporcionou a maior indução, porém sem diferir significativamente de acibenzolar-S-metil (100 mg L⁻¹). Para soja, no entanto, não houve indução.

Neste trabalho, o controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro proporcionado pelos extratos aquosos obtidos de formulado pó solúvel de *P. sanguineus*, associado a ausência de atividade antimicrobiana direta sobre *A. solani* e *X. vesicatoria*, indicam que o provável mecanismo envolvido seja a indução de resistência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br.

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. 2008. Disponível em www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409.

ASSI, L. **Controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et. Magn.) Scrib, na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo extrato do cogumelo *Pycnoporus sanguineus* (L. ex. Fr.)**. Marechal Cândido Rondon. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 51p. 2005.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. Avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.311-315, 2006a.

BALBI-PEÑA, M.I.B.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p.401-404, 2006b.

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. Marechal Cândido Rondon. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 72p. 2008.

BALDO, M.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; FRANZENER, G.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Inibição da germinação de esporos de *Phakopsora euvtis* e *Uromyces appendiculatus* pelo extrato de *Pycnoporus sanguineus*. Congresso Paulista de Fitopatologia, 31, Campinas. **Summa Phytopathologica**, v. 34 (suplemento), p. 94, 2008.

BALDO, M.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus* e inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.4, p.174-179, 2011.

DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n.1, 2004.

DI PIERO, R.M.; WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.169-174, 2006.

FERREIRA, D.F. **Sisvar versão 5.3**. DEX/UFLA. 2003.

FIORI-TUTIDA, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 287-289, 2007.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* no controle de ferrugem asiática em soja**. Marechal Cândido Rondon. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 118p. 2008.

KUROZAWA, C; PAVAN, A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. V.2, São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. p.690-719, 2005.

LOPES, C.A; QUEZADO-SOARES, A.M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOMIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas**. Vol. 2. Viçosa: os editores. 2000. p.757-800.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 37-47.

MELLO, S.C.M., TAKATSU, A.; LOPES, C.A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.447-448, 1997.

PEITER-BENINCA, C.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V.C.; NOGUEIRA, M.A.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

POPIA, A.F.; CIDADE JÚNIOR, H.A.; HAMERSCHMIDT, I.; TOLEDO, M.V.; ASSIS, O. **Manual de olericultura orgânica**. Curitiba: EMATER/SEAB, 2007. 128 p.

PULZ, P.; MASSOLA JR., N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. solani*. **SummaPhytopathologica**, v.35, n.2, p.121-126, 2009.

SMÂNIA, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.F.A.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.177-181, 1995.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr, A.; LEITE, C.L. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.4, 1998.

STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Estratégias de seleção e uso de extratos de plantas no controle microbiano *in vitro*. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Org.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. 1ª ed. Brasília/DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, v. 1, p. 293-345.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. p.1033-1042.

TOILLIER, S.L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; VIECELLI, C.A.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.99-110, 2010.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.73-80, 2010.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.87-96, 2009.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Produtos formulados estáveis, na forma de pó solúvel, de folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa*) e basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*, não apresentaram atividade antimicrobiana direta *in vitro* contra *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria*, o que caracteriza então, esses produtos como potenciais indutores de resistência.

In vivo, os testes de estabilidade do pó solúvel armazenado a 40 °C por 0, 60, 120 e 180 dias e testados em cinco concentrações (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) foram validados para o tempo de prateleira de 24 meses, constatando-se ainda que os extratos proporcionaram o mesmo nível de controle da pinta preta e da mancha bacteriana que os tratamentos controles utilizados, com eficiência de até 75% para alecrim, 74% para cúrcuma e 79% para *P. sanguineus*, sendo que a melhor concentração calculada para todos os extratos foi em média de 130 mg L⁻¹. Nos ensaios de avaliação dos intervalos de aplicação, pulverizações a cada sete dias apresentaram maior nível de controle.

Avaliando-se os dados de forma conjunta, para os três tipos de pó solúvel, não se constatarem diferenças significativas para os mesmos. Assim, a utilização de um ou outro extrato dependerá daquele que estiver a disposição, considerando-se a época do ano e a disponibilidade de alecrim, cúrcuma ou *P. sanguineus*.

Estes resultados demonstram a eficiência do controle da pinta preta e da mancha bacteriana do tomateiro, provavelmente por indução de resistência, pelo extrato aquoso obtido de formulação pó solúvel de *R. officinalis*, *C. longa* e *P. sanguineus*.