

EXTRATOS DE JUREMA PRETA NO CONTROLE DE MANCHA-DE-ALTERNARIA EM MELANCIA¹

IVANILDO VIANA BORGES^{2*}, ANA ROSA PEIXOTO², LEONARDO SOUSA CAVALCANTI³, MERIDIANA ARAÚJO GONÇALVES LIMA², MATHEUS SILVA E SILVA²

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de extratos aquosos (EAC), etanólicos (EEC) e decócto (EDC) das cascas de *Mimosa tenuiflora* e aquoso de raízes (EAR), no controle da mancha-de-alternaria em melancia, assim como avaliar o modo de ação desses extratos, seja por apresentar toxidez ao patógeno e a capacidade desses em alterar o metabolismo do hospedeiro ativando enzimas de proteção. Os extratos de *M. tenuiflora* foram testados quanto à inibição da germinação, crescimento micelial e esporulação de *Alternaria cucumerina*, *in vitro*. Em ambiente controlado (*in vivo*), as plantas foram pulverizadas com os quatro extratos em três concentrações (0,5; 4,0 e 10 mg.mL⁻¹) 48 horas antes da inoculação. As avaliações foram efetuadas com base na severidade da doença e determinação da atividade enzimática. Em campo os quatro extratos foram pulverizados em duas concentrações (4,0 e 10 mg.mL⁻¹), avaliando-se a severidade da doença com auxílio de escala descritiva. O EAC inibiu 100% da germinação, crescimento micelial e esporulação *in vitro*. O EAC induziu síntese de β-1,3 glucanase e peroxidase, reduzindo 97% da doença em ambiente controlado e 31% em campo, sendo superior aos demais extratos e aos fungicidas comerciais: oxiclureto de cobre que controlou 79% e 21% para ambiente controlado e campo respectivamente; e o tebuconazol + trifloxistrobina que controlou 15% em campo. Esses extratos apresentaram potencial para o controle de mancha-de-alternaria seja causando toxidez ao patógeno ou através da indução de resistência.

Palavras-chave: *Mimosa tenuiflora*. *Alternaria cucumerina*. Peroxidase. β-1,3 glucanase.

JUREMA PRETA EXTRACTS IN CONTROL OF ALTERNARIA LEAF SPOT WATER-MELON

ABSTRACT - This study had the objective to evaluate the action of aqueous (EAC), ethanolic (EEC) and decoction (EDC) extracts of juremapreta bark *Mimosa tenuiflora* and aqueous root extract (EAR) on the control of alternaria black spot on watermelon, as well as evaluating the mode of action of these extracts, either by presenting toxicity to the pathogen and the ability to alter the metabolism of the host by activating protective enzymes. *M.tenuiflora* extracts were tested for inhibition of germination, mycelial growth and sporulation of *A.cucumerina in vitro*. Under controlled conditions (*in vivo*), the plants were sprayed with the four extracts in three concentrations (0,5, 4.0 and 10 mg.mL⁻¹) 48 hours before inoculation. The evaluations were based on disease severity and determination of enzymatic activity. In the field the four extracts were sprayed at two concentrations (4.0 and 10 mg.mL⁻¹), evaluating the severity of the disease with the help of descriptive scale. The EAC inhibited 100% germination, mycelial growth and sporulation of *A.cucumerina in vitro*. The EAC induced synthesis of β-1,3 glucanase and peroxidase, reducing 97% of the disease, in a controlled environment and 31% in the field, being superior to the other extracts and commercial fungicides: copper oxychloride which controlled 79% and 21% for environmental controlled and field respectively, and tebuconazole + trifloxystrobin which controlled 15% in the field. These extracts showed potential to control alternaria leaf spot is caused toxicity to the pathogen or by inducing resistance.

Keywords: *Mimosa tenuiflora*. *Alternaria cucumerina*. Peroxidase. β-1,3 glucanase.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 13/05/2012; aceito em 20/03/2013

Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada ao programa de Pós-graduação em Agronomia/PPHI – Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada, DTCS/UNEB.

²Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, DTCS/UNEB, av. Edgard Chastinet, s/n, Campus III, Juazeiro-BA, Brasil, 48905-680, Ivanildo.borges@univasf.edu.br

³Universidade do Vale do São Francisco, UNIVASF, av. ACM, 510, 48902-300, Juazeiro-BA; leonardo.cavalcanti@univasf.edu.br

INTRODUÇÃO

A produção de melancia (*Citrulluslanatus* (Thunb.) Matsumura&Nakai) é limitada pela ocorrência de doenças, dentre elas a mancha-de-alternária, causada pelo fungo *Alternaria cucumerina* (Ell&Ev.) Elliot. Essa doença surge no final do ciclo da cultura diminuindo a área fotossintética, expondo os frutos ao sol, podendo ainda ocasionar a morte da planta.

O controle fitossanitário para evitar perdas na produção é realizado através de fungicidas químicos que contaminam o ambiente e provocam sérios prejuízos a saúde do homem, sendo que essas desvantagens podem ultrapassar as vantagens associadas ao seu ganho de produtividade (VEIGA et al., 2006).

As contaminações causadas pelos agrotóxicos no controle de doenças em plantas têm levado os pesquisadores a verificar a ação de extratos vegetais, óleos essenciais e filtrados de micélios de fungos na busca de moléculas capazes de controlar doenças em plantas sem que haja contaminação do ambiente, seja por apresentarem atividade antimicrobiana direta ou indutora de resistência sistêmica em plantas (PEREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2007; LATHA et al., 2009).

Extratos de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), espécie nativa da Caatinga, possuem atividade antimicrobiana associada à ação de taninos, saponinas e flavonoides, que estão presentes em todas as partes da planta, principalmente nas cascas. Estudos realizados por Bezerra et al. (2011) revelaram que os extratos da casca dessa planta apresenta atividade bactericida e bacteriostática, mesmo em baixas concentrações.

A resistência sistêmica, por outro lado, pode ser ativada por agentes de origens diversas, capazes de conferir à planta proteção contra uma série de patógenos não específicos. As alterações causadas por esses agentes no metabolismo celular podem ser evidenciadas pela expressão das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3 glucanase, quitinase e fenilalanina amônia-liase, reduzindo significativamente a doença, porém sem atuar diretamente sobre o patógeno (PEREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. sobre *A. cucumerina* *in vitro* e *in vivo* em melancia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas cascas de caule e raízes de *M. tenuiflora* em área de Caatinga, Petrolina-PE, no mês de abril de 2010, seguindo as coordenadas geográficas, 9°19' S, 40°31' W. Os ensaios foram desenvolvidos nos laboratórios de Bioquímica e Química Orgânica, Fisiologia vegetal e Microbiologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco

(UNIVASF) Campus Juazeiro-BA e Laboratório de Fitopatologia e campo experimental de olerícolas da Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (UNEB-DTCS) Campus III, em Juazeiro-BA.

O material vegetal coletado foi seco ao ar (35 – 40 °C) e macerado em moinho. Posteriormente, foram preparados três extratos da casca do caule: extrato aquoso (EAC); extrato etanólico (EEC utilizando-se etanol 92%); extrato decócto (EDC) e um extrato aquoso de casca da raiz (EAR). Para o preparo de cada extrato foram utilizados 50 gramas do material vegetal para 200 mL da solução extratora (água ou álcool). Os extratos EAC, EEC e EAR foram obtidos pelo método da maceração e ficaram em contato com a solução extratora durante 72 horas, enquanto o EDC foi obtido via decocção, sendo aquecido até atingir 100 °C. Os extratos foram filtrados com papel de filtro e somente os EAC e EEC foram transferidos para bandejas até a evaporação de toda a solução extratora.

As concentrações dos extratos foram ajustadas através da equação linear $y = 0,00111 + 0,02832x$; $R^2 = 0,99$, obtida através do programa computacional Origin 7.0, onde, “y” representa a absorbância e “x” a concentração em mg.mL^{-1} . Para obtenção da curva foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 550 nm de soluções aquosas com concentrações conhecidas do EAC (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mg.mL^{-1}).

O isolado de *A. cucumerina* foi obtido de plantio de melancia com sintomas característicos da doença, localizado no campo experimental de olerícolas do DTCS-UNEB. O material vegetal foi conduzido ao Laboratório de Fitopatologia do DTCS-UNEB para isolamento e realização dos postulados de Kock, conforme metodologia descrita por Menezes e Assis (2004), para confirmação da patogenidade do isolado o qual posteriormente foi preservado em água destilada e óleo mineral.

Para o preparo da suspensão de esporos, cultivou-se o patógeno em meio de cultura BDA (Batata, 200 g; Dextrose, 20 g; Agar, 17 g.L^{-1}) durante oito dias sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio). Após seis dias de incubação, foram realizadas abrasões sobre o crescimento micelial com o objetivo de estimular a esporulação. Ao atingir oito dias de incubação, foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada (ADE) em cada placa de Petri o crescimento fúngico foi retirado com auxílio de uma escova para liberação dos esporos. A concentração da suspensão de esporos foi determinada em câmara de Neubauer e expresso em esporos. mL^{-1} .

Na avaliação da germinação de *A. cucumerina* sobre os extratos de *M. tenuiflora*, suspensão de 40 μL a 10^5 esporos. mL^{-1} foi adicionada às cavidades da placa de ELISA contendo 40 μL dos extratos (EAC, EEC, EDC, EAR) previamente esterilizados em filtro milipore (0,2 μm) em dez concentrações

(0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg.mL⁻¹). Para o tratamento testemunha utilizou-se ADE em substituição aos extratos. As placas de ELISA foram incubadas em BOD durante 20 horas sob luz constante e temperatura de 25 °C. Considerou-se germinados os esporos que apresentavam tubo germinativo igual ou maior que o esporo, conforme Itako et al. (2008). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com oito repetições e as médias dos tratamentos foram submetidas à regressão na análise de variância.

Para avaliação do crescimento micelial e esporulação, 1,0 mL dos extratos esterilizados (EAC, EEC, EDC, EAR) foi adicionado a BDA fundente e vertido em placas de Petri, sendo a concentração dos extratos proporcional a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 5mg.mL⁻¹ de BDA. Após a solidificação do meio foram adicionados 40 µL de suspensão (10⁵ esporos.mL⁻¹) no centro de cada placa. Como parâmetro foram utilizadas duas plantas controle, sendo uma com a adição de fungicida (oxicloreto de cobre na 1 mg.mL⁻¹) e outra sem adição de qualquer produto. As placas foram incubadas, em BOD durante oito dias sob fotoperíodo de 12 horas a 28 °C. A avaliação do crescimento micelial (CM) e esporulação foi realizada após oito dias de incubação, sendo o CM mensurado através do diâmetro da colônia em sentidos diametralmente opostos, com auxílio de régua milimetrada. As médias dos valores dos diâmetros foram obtidas para determinar o CM. Os dados de CM foram transformados em percentagem de inibição, obtido em relação ao diâmetro da placa de Petri (Ø PP), utilizando-se a seguinte equação, Inibição (%) = ØPP - CM x 100/ ØPP. A esporulação foi determinada utilizando-se a metodologia citada anteriormente para obtenção da suspensão de esporos.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial duplo 4x5+2 sendo quatro extratos, cinco concentrações e duas testemunhas. As medias das cinco repetições foram comparadas pelo teste de Scott-knott (p<0,05).

Com o propósito de estudar a ação dos extratos de *M. tenuiflora* na severidade da mancha-de-alternária, sementes de melancia da Cultivar Crimson Sweet foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial. Transcorridos 15 dias da semeadura, as mudas foram transplantadas para copos de polietileno com capacidade de 400 mL, contendo substrato comercial e cultivadas em casa de vegetação. Quando as plantas apresentavam, pelo menos, três folhas definitivas. Os quatro extratos de *M. tenuiflora* (EAC, EEC, EDC e EAR) nas concentrações de 0,5; 4,0 e 10 mg.mL⁻¹ foram pulverizados nas plantas até o escorrimento. Posteriormente as plantas foram mantidas em ambiente com temperatura de 27 °C e umidade relativa de 52% (variação +/- 2).

Após 48 horas da aplicação dos extratos, realizou-se a inoculação de *A. cucumerina* por pulverização da suspensão de 10⁵ esporos.mL⁻¹ permanecen-

do as plantas em câmara úmida durante 48 horas. Após 24 horas da inoculação foi realizada nova aplicação dos extratos. Como parâmetro utilizou-se duas plantas controle, uma inoculada com o patógeno e a outra inoculada e tratada com Oxicloreto de cobre (1 mg.mL⁻¹).

A avaliação da severidade da doença foi iniciada 96 horas após a inoculação, sendo realizadas cinco avaliações da severidade com intervalo de 24 horas, e posterior cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), através da fórmula AACPD = Σ(y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i), onde: n = número de avaliações; y = severidade da mancha-de-alternária (%); t = tempo (dias) (SHANER; FINNEY, 1977).

A severidade da doença foi quantificada em percentagem de área foliar necrosada utilizando-se o programa computacional QUANT. Para tanto foi necessário fazer fotografias das folhas de todas as unidades experimentais utilizando-se uma câmara digital com resolução de 12 megapixels, as quais foram processadas no QUANT.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições em esquema fatorial duplo 4x3+2, sendo, quatro extratos, três concentrações e duas testemunhas. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O período de incubação (PI) compreendido entre a inoculação e o surgimento da doença foi avaliado em horas, sendo o delineamento experimental inteiramente casualizado e as medias das cinco repetições comparadas pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade

Para estudo da ação enzimática foi retirada uma folha de cada unidade experimental, 48 horas após a indução com os extratos e 48 horas após a inoculação de *A. cucumerina*. Em seguida, as folhas foram armazenadas em freezer a 0 °C e posteriormente, pesadas e maceradas em almofariz, em banho de gelo, com 5 mL de tampão (acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 5,0 e polivinilpirrolidona (PVP) a 1% e EDTA 0,01 mol.L⁻¹). Os extratos foram centrifugados a 20.000g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para microtubo e armazenado em freezer a 0 °C para posterior determinação das enzimas, conforme metodologia descrita por Guimarães et al. (2010).

A atividade da peroxidase foi avaliada pela oxidação do guaiacol (C₃H₈O₂) na presença do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tetraguaiacol. Para ocorrer a reação uma alíquota de 25 µL de guaiacol (0,02 mol.L⁻¹), 1,0 mL do tampão acetato (0,1 mol.L⁻¹, pH 5,0), 250 µL de peróxido de hidrogênio (0,38 mol.L⁻¹) e 500 µL do extrato enzimático foram transferidos para uma cubeta espectrofotométrica. A mistura foi agitada levemente e imediatamente colocada no espectrofotômetro a 470 nm por dois minutos para realização das leituras da atividade enzimática. Para prova em “branco” o extrato enzimático foi

substituído por água. Os resultados foram expressos em termos de atividade de peroxidase.mim⁻¹(g.p.f.)⁻¹

A atividade de β -1,3-glucanase foi avaliada pelo aumento dos grupos redutores de açúcares, usando como substrato a Laminarina (*Laminaria digitata*), sendo que uma unidade do grupo redutor foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mM de glicose em um minuto a 40 °C. Na quantificação de β -1,3-glucanase, 150 μ L do extrato enzimático, 150 μ L de tampão acetato de sódio (0,1 mol.L⁻¹ pH 5,0) e 150 μ L de Laminarina (4,0 mg.mL⁻¹) foram transferidos para tubos de ensaio e incubados por uma hora a 40 °C em banho-maria. Após esse período, foram adicionados 200 μ L de fenol a 5% e 830 μ L de ácido sulfúrico concentrado, para determinação dos monômeros de glicose liberados na reação. A reação foi incubada por mais cinco minutos a 100 °C em banho-maria e, posteriormente, foi paralisada em banho de gelo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 480 nm de absorbância e comparadas com padrões de glicose. A curva padrão de glicose foi constituída nas seguintes concentrações 0,5; 10; 20; 40; 80; 160 μ g.mL⁻¹. Para prova em “branco” o extrato enzimático foi substituído por água

Os dados obtidos nos dois sistemas enzimáticos foram submetidos à análise de variância e as médias das seis repetições comparadas pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade.

O experimento de campo foi realizado entre os meses de agosto e novembro de 2010 na área de olerícolas do DTCS/UNEB. Mudanças de melancia da cultivar Pérola foram preparadas seguindo metodologia descrita anteriormente e transplantadas para o campo com espaçamento 1,2 x 3,0 metros e irrigação por sulco com turno de rega de dois dias. Foi realizada adubação de fundação (N-10; P-10; K-10) 15 dias antes do plantio e de cobertura 30 dias após o plantio, com a mesma formulação. Foram utilizados os extratos (EAC, EEC, EDC, EAR), nas concentrações

de 4,0 e 10 mg.mL⁻¹, oxicleto de cobre (1 mg.mL⁻¹) e tebuconazol + trifloxistrobina a 1% (v/v) como tratamentos padrão e água como testemunha, por meio de pulverizador manual. As pulverizações se iniciaram 30 dias após o transplante, totalizando seis aplicações com intervalo de cinco dias, ao final dos quais realizou-se cinco avaliações da severidade com intervalo de cinco dias utilizando uma escala descritiva variando de 0 a 5 adaptada de Halfeld-Vieira e Nechet (2006), onde: 0- sem sintomas, 1- 1 a 27%; 2 - 28 a 45%; 3- 46 a 71% 4- 72 a 93% e 5- planta morta. As notas atribuídas à severidade da doença foram transformadas em índice de infecção da doença (AACPD), através da fórmula AACPD = $\sum(y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i)$, onde: n = número de avaliações; y = severidade da mancha-de-alternária (%); t = tempo (dias) (SHANER; FINNEY, 1977).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições, sendo três plantas por repetição. As médias de AACPD foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de *M. tenuiflora* obtidos de cascas do caule e cascas de raízes apresentaram diferenças quanto à germinação de *A. cucumerina*.

O EAC obtido via maceração apresentou efeito fungistático/fungitóxico inibindo 100% da germinação de *A. cucumerina* a partir da concentração de 2,5 mg.mL⁻¹, sendo a germinação reduzida em média mais de 50% desde a concentração de 0,5 mg.mL⁻¹. Pela análise de regressão, a equação quadrática é a que melhor explica a variação da germinação em função das concentrações do EAC, a qual representa coeficiente de determinação de 78% (Figura 1A).

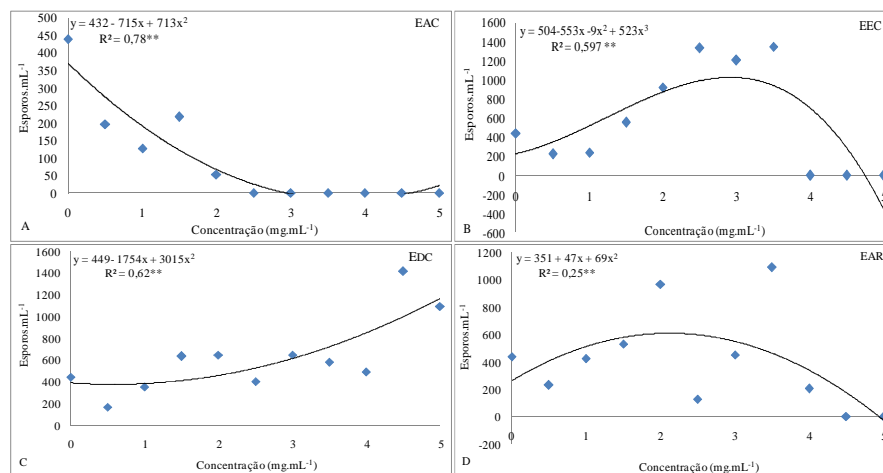


Figura 1. Germinação de esporos de *Alternaria cucumerina* em extratos de cascas e raízes de *Mimosa tenuiflora*, ajustados pelas equações de regressão. (A) EAC - Extrato aquoso da casca; (B) EEC - Extrato etanólico da casca; (C) EDC - Extrato decócto da casca; (D) EAR - Extrato aquoso de raiz. ** Modelos matemáticos de regressão significativos a 1% de probabilidade pelo Teste F.

A atividade antimicrobiana dos extratos de *M. tenuiflora* provavelmente está associada à presença de taninos em todas as partes da planta, inclusive, nas cascas. Os taninos atuam formando complexo com proteínas e íons metálicos, inibem enzimas e afetam a utilização de vitaminas proporcionando efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005). Estudos realizados por Guimarães-Beelen et al. (2006) comprovaram o efeito negativo dos taninos presentes em *Mimosa tenuiflora* e outras leguminosas, os quais inibiram o desenvolvimento de *Ruminococcus flavefaciens*, (Sijpesteijn) em 80,3% na dosagem de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de taninos.

Os EEC e EAR reduziram a germinação dos esporos para 50% em média na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} em relação a testemunha (concentração 0,0 mg.mL^{-1}) e induziram o aumento nas concentrações seguintes (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mg.mL^{-1}) alcançando pico de germinação na concentração de 3,5 mg.mL^{-1} (Figura 1B e 1D).

A partir de 4,0 mg.mL^{-1} houve inibição de 100% da germinação com a utilização do EEC (Figura 1B), enquanto o EAR alcançou essa mesma eficiência a partir da concentração 4,5 mg.mL^{-1} (Figura 1D). Os modelos matemáticos de regressão utilizados para explicar a resposta da germinação em função da concentração desses extratos explicaram apenas 59,7% para o EEC e 25% para EAR. Nesses dois casos, foi possível determinar apenas a concentração em que a germinação é totalmente inibida.

O estresse proporcionado pelos extratos de *M. tenuiflora* aos esporos de *A. cucumerina* induziu a reprodução secundária (Figura 2), em que os esporos surgem diretamente do corpo do esporo matriz e emitem tubos germinativos em todas as direções, aumentando a esporulação e germinação, e em consequência aumentam as chances de sobrevivência, dispersão e infecção. Entretanto, os extratos EAC, EEC e EAR apresentaram condição de estresse em concentrações distintas, que superam o mecanismo de esporulação secundária, inibindo a germinação dos esporos. A reprodução secundária de *A. cucumerina* e outras espécies de *Alternaria* foram descritas por Rotem e Bashi (1969) quando submetem os esporos a diferentes estresses físicos e químicos.



Figura 2. Figura capturada em microscópio óptico com aumento de 40x com auxílio de câmara digital 12 megapixels e aumento de 6x. Conidiação: esporo secundário,

indicado pela seta preta, surgindo diretamente do esporo matriz, indicado pela seta vermelha, após 20 horas de incubação, em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) contendo extrato aquoso da casca de *Mimosa tenuiflora* na concentração de 5 mg.mL^{-1} .

Em relação ao EDC (Figura 1C) houve redução de 63% da germinação na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} . Atingindo máxima germinação na concentração de 4,5 mg.mL^{-1} , não sendo possível observar inibição total da germinação nesses tratamentos. Resultados semelhantes foram observados por Bezerra et al. (2011) ao avaliarem a ação dos extratos de *M. tenuiflora* na inibição de bactérias. Esses autores observaram que a concentração mínima inibitória (CIM) para o extrato obtido a frio foi de 0,62% enquanto que para o extrato aquecido a CIM foi 2,5%, indicando que o aquecimento causa decomposição dos compostos com atividade antimicrobiana.

A baixa eficiência de extratos que sofreram tratamento térmico também foram observados por Balbi-peña et al. (2006a), ao avaliar extrato de *Curcuma longa* autoclavado e não autoclavado. O extrato autoclavado não apresentou atividade quanto ao crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. solani* enquanto o extrato não autoclavado reduziu até 87% da esporulação e 38,2% do crescimento micelial.

Na avaliação do crescimento micelial e esporulação de *A. cucumerina*, foram observadas diferenças significativas entre os extratos, concentrações e entre as interações, exceto da testemunha padrão, utilizando oxicloreto de cobre (Tabela 1).

Dentre os extratos, o EAC apresentou maior percentagem de inibição do crescimento micelial, seguidos pelos EAR, EEC e EDC, os quais inibiram 100; 90; 71 e 53%, respectivamente, na concentração de 5,0 mg.mL^{-1} . O EAC na concentração de 0,5 mg.mL^{-1} apresentou a maior inibição do crescimento micelial (52%) dentre os extratos nas concentrações abaixo de 5,0 mg.mL^{-1} e esporulação igual a testemunha. Esses dados revelam que o extrato nessa concentração inibe o crescimento micelial e não induz a produção secundária de esporos (Tabela 1), como observado por Senhor et al. (2009) ao avaliarem a ação *in vitro* do Thiabendazole e azoxystrobin. Esses fungicidas inibiram o crescimento micelial de *A. Alternata* em 52,5% e 36% respectivamente e induziram a esporulação em 620% e 40% respectivamente em relação à testemunha.

O EAR foi o mais eficiente na inibição da esporulação, na concentração de 5,0 mg.mL^{-1} , proporcionando 100% de inibição. Nessa concentração todos os extratos mostraram-se mais eficientes. Os EAC e EAR apresentaram resultados promissores, com destaque para o EAC que inibiu 100% do crescimento micelial, esporulação e germinação, na menor concentração, enquanto o EAR mostrou maior eficiência para esporulação, reduzindo-a em todas as concentrações avaliadas (Tabela 1). Enquanto os

Tabela 1. Inibição do crescimento micelial e esporulação de *Alternaria cucumerina* na presença de extratos de *Mimosa tenuiflora*.

Extratos (E)	Inibição do crescimento micelial (%)					Esporulação (conídios.mL ⁻¹)				
	Concentração (C) (mg.mL ⁻¹)									
	0,5	1	1,5	2	5	0,5	1	1,5	2	5
¹ EAC	52 aB	43 aC	33 aC	51 aB	100 aA	4,2 aA	4,7 aA	5,4 aA	3,8 cA	0 aB
² EEC	22 bC	51 aB	35 aC	31 bC	71 bA	5,5 aB	3,3 bC	5,2 aB	7,7 aA	1,7 aC
³ EDC	47 aA	27 bB	29 aB	25 bB	53 cA	2,4 bB	5,4 aA	4,9 aA	5,6 bA	1,1 aB
⁴ EAR	1 cD	26 bC	43 aB	46 aB	90 aA	2,6 bA	2,6 bA	2,2 bA	1,4 dA	0 aA
Testemunha (T)				9					4	
Fungicida (F)				0					5	
Interação (E x C) x F + T				**					*	
CV (%)				22					46	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de probabilidade. ** = significativo a 1% de probabilidade; * = significativo a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para $X = \sqrt{x}$. ¹Extrato aquoso da casca; ²Extrato etanólico da casca; ³Extrato decócto da casca e ⁴Extrato aquoso da casca de raiz.

EEC e EDC apresentaram resultados inferiores em relação ao crescimento micelial e esporulação, principalmente na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹, indicando que tanto o solvente quanto o método de extração influenciam na obtenção de compostos bioativos de *M. tenuiflora*.

Os tratamentos que apresentaram esporulação superior à testemunha provavelmente desenvolveram o sistema secundário de esporos, com destaque para o EEC na concentração de 2,0 mg.mL⁻¹, que induziu a esporulação em 95% superior a testemunha. Essa afirmação pode ser confirmada pelas observações realizadas em microscópio óptico. Sob as condições mais estressantes (5,0 mg.mL⁻¹), as células (protoplastos) surgiram diretamente do esporo matriz ficando totalmente expostas sem a proteção da parede celular, entretanto, essas células não conseguiram se desenvolver sobre o meio com o extrato (Figura 3).



Figura 3. Figura capturada em microscópio óptico com aumento de 40x com auxílio de câmara digital 12 megapixels e aumento de 6x. Esporulação de conídio liberando várias células do corpo, indicado pelas setas pretas, em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar), após oito dias de incubação, contendo extrato aquoso de raiz de *Mimosa tenuiflora* na concentração de 5 mg.mL⁻¹.

O processo de infecção é dependente das funções da parede celular, a qual somente emitirá o tubo

germinativo em ambiente favorável ao estabelecimento do micélio. Esse mecanismo é controlado por substâncias localizadas no esporo que o impedem de geminar em condições desfavoráveis (CHITARRA et al., 2004).

O fungicida oxicleto de cobre (1 mg.mL⁻¹) utilizado como referência não inibiu o crescimento micelial nem a esporulação do patógeno, não diferindo significativamente da testemunha.

Trabalhos realizados com extratos vegetais têm mostrado sua eficiência quando comparado com fungicidas comerciais, a exemplo do extrato de manjeriço que apresentou eficiência similar ao fungicida mancozeb sobre a esporulação de *Chalaraparadoxa* (De Seynes) Sacc. e controle pós-colheita da podridão negra do abacaxizeiro (BRITO et al., 2011).

Os extratos de *M. tenuiflora* originados de cascas e raízes controlaram o desenvolvimento da mancha-de-alternária em mudas de melancia, cultivadas em ambiente controlado, os quais apresentaram comportamento semelhante, não havendo interação entre as concentrações e os extratos no controle da doença, sendo que a significância do teste “F” para a variável concentração dos extratos foi significativa a 5% de probabilidade, e todos os extratos apresentaram controle em relação à testemunha (Tabela 2).

Observou-se que os extratos aplicados em baixas concentrações apresentaram as menores médias de AACPD e maior controle da doença, havendo um aumento significativo ($p < 0,05$) da AACPD com o aumento da concentração dos extratos. O EAC aplicado na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ proporcionou menor AACPD e maior período de incubação ($p < 0,05$) (Tabela 2). A AACPD para esse extrato variou de 5 a 54 progressivamente nas concentrações de 0,5 a 10 mg.mL⁻¹, as quais correspondem a 97 e 67% de controle da doença, enquanto a testemunha alcançou uma AACPD de 167. Provavelmente, com o aumento da concentração dos extratos,

Tabela 2. Período de incubação, Percentual de controle e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de mancha-de-alternária em melancia tratada com extratos de *Mimosa tenuiflora*.

Extratos (E) ^{ns}	P.I (horas)			Controle (%)			AACPD		
	Concentração (C) (mg.mL ⁻¹)								
	0,5	4	10	0,5	4	10	0,5	4	10
¹ EAC	129,6 a	81,6 b	81,6 b	97	72	67	5 a	46 ab	51 b
² EEC	105,6 a	106 a	72 b	94	73	35	10 a	45 ab	109 b
³ EDC	76,8 b	48 c	62 c	85	87	36	25 a	21 ab	106 b
⁴ EAR	76,6 b	57,6 c	57,6 c	91	67	68	15 a	54 ab	53 b
Fungicida (F) (1 mg.mL ⁻¹)	48 c						34		
Testemunha (T)	72 b						167		
CV (%)	28						58		

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade; Os dados foram transformados para $X = \sqrt{x}$. (P.I) Período de incubação; (AACPD) Área abaixo da curva de progresso da doença. ¹Extrato aquoso da casca; ²Extrato etanólico da casca; ³Extrato decócto da casca e ⁴Extrato aquoso da casca de raiz.

houve o desenvolvimento da produção secundária de esporos, como pode ser observado na Figura 1 e Tabelas 1 e 2 sendo que, nos experimentos *in vitro*, houve concentrações que superaram o sistema secundário de esporos inibindo 100% da germinação e esporulação.

O tratamento convencional da doença com oxiclreto de cobre na dosagem de 1,0 mg.mL⁻¹ também apresentou controle (79%) inferior aos tratamentos com os extratos aplicados na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ (Tabela 2).

Maior eficiência de extratos vegetais nas menores concentrações também foi verificado por Itako et al. (2009) ao avaliarem extrato bruto aquoso de *Cymbopogon citratus* no controle da cladosporiose em tomateiro. O extrato *Cymbopogon citratus* na concentração de 10% reduziu o número de lesões causadas por *C. fulvum* em aproximadamente 63% em relação à testemunha enquanto a aplicação dos mesmos na concentração de 20%, a redução foi da ordem de 17%. Extratos de *Lentinula edodes*-96/17 na concentração 10% controlou 66% da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. enquanto esse extrato aplicado na concentração de 20% controlou 28,3%. O extrato de *Agaricus blazei* - 26 também apresentou mesmo comportamento (SILVA et al., 2007).

OS EEC, EDC e EAR apresentaram o mesmo comportamento em função da concentração. No entanto, os EEC e EDC na concentração de 10 mg.mL⁻¹ controlaram em média 35,5% da doença, enquanto os EAC e EAR controlaram 67,5%, sugerindo melhor efeito dos extratos aquosos obtidos por maceração. Esses dados revelam diferenças na eficiência dos extratos de mesma origem, mas obtidos de formas diferentes seja variando o método de extração, o solvente utilizado e as diferentes partes da planta e esses dependentes de concentração. Diferenças quanto a essas variáveis foram observados por Marazo et

al. (2008) que relataram diferenças quanto a ação de compostos ativos obtidos de pitangueira na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja por diferentes métodos de extração e solventes (extrato alcoólico, decocção, infusão, maceração e óleo essencial) os quais são dependentes de concentração.

Nas análises enzimáticas, o EAC a 0,5 mg.mL⁻¹ ativou a síntese de peroxidase 48 horas após a indução, apresentando diferença (p<0,05) entre a testemunha e os demais extratos avaliados (EEC, EDC e EAR). Houve aumento de 47% na atividade da peroxidase no tratamento com EAC na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ em relação à testemunha. Quarenta e oito horas após a inoculação com *A. cucumerina* houve aumento significativo (p<0,05) da peroxidase em todos os tratamentos (Tabela 3). Estudos realizados por Shahbazi et al. (2010) verificaram que a atividade da peroxidase está relacionada a resistência do hospedeiro e virulência do patógeno. Estes autores constataram que os maiores picos de peroxidase foram alcançados 48 e 72 horas após a inoculação de um isolado agressivo de *A. solani* em uma cultivar de batata resistente. Nesses tratamentos houve redução da severidade da Pinta preta em relação a cultivar susceptível inoculada com o mesmo isolado.

Indução da peroxidase na presença do patógeno foi verificada por Vigo-Schulz et al. (2006) ao inocular *Xanthomonas campestris* sp. *campestris* (Dowson) Dye em folhas de couve-flor. Segundo Bindschedler et al. (2006) atividade da peroxidase, localizada na parede celular, e a NADPH-oxidase, localizada na membrana plasmática são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentre elas peróxido de hidrogênio, em resposta a infecção por patógenos e seus derivados.

Em relação à β -1,3 glucanase, houve incremento de aproximadamente 95% em relação à testemunha para o EAC e EAR nas concentrações de 0,5 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹ respectivamente. Esses apre-

Tabela 3. Indução de peroxidase e β -1,3 glucanase em mudas de melancia tratadas com extratos de *Mimosa tenuiflora* antes e depois da inoculação com *Alternaria cucumerina*.

Atividade enzimática	48 horas após a indução						48 horas após a inoculação					
	Peroxidase*			β -1,3 glucanase*			Peroxidase*			β -1,3 glucanase*		
	Concentração (mg.mL ⁻¹)											
EXTRATOS	0,5	4	10	0,5	4	10	0,5	4	10	0,5	4	10
¹ EAC	2,33 a	1,16 b	0,73 b	34,30 a	22,97 a	20,03 b	2,35 a	2,09 a	2,35 a	19,00 b	10,79 b	11,03 b
² EEC	1,18 b	1,46 b	1,97 a	12,98 b	15,62 b	10,85 b	2,24 a	1,94 a	2,27 a	11,50 b	10,55 b	13,81 b
³ EDC	0,95 b	1,08 b	1,17 b	9,26 b	15,92 b	18,55 b	2,58 a	2,48 a	2,11 a	14,01 b	13,29 b	15,55 b
⁴ EAR	0,45 b	1,33 b	0,44 b	26,68 a	29,32 a	34,09 a	2,22 a	1,71 a	2,47 a	12,17 b	9,77 b	15,87 b
Testemunha	1,58 b			17,45 b			2,76 a			20,47 b		
CV (%)	63,56			65,93			63,56			65,93		

*A atividade enzimática de Peroxidase expresso em Atividade de peroxidase x 10⁻⁴.(g.p.f)⁻¹.min⁻¹ e β -1,3 glucanase expressa em μ g de glucose.mL⁻¹; (g.p.f) – grama de peso fresco. ¹Extrato aquoso da casca; ²Extrato etanólico da casca; ³Extrato decócto da casca e ⁴Extrato aquoso da casca de raiz. Os dados da atividade de peroxidase foram transformados para X= \sqrt{x} . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

sentaram diferenças significativamente (p<0,05) superiores a testemunha e aos EEC e EDC. Os maiores picos foram induzidos pelos extratos aquosos de casca e raiz 48 horas após a indução com os extratos em todas as concentrações, exceto para o EAC na concentração de 10 mg.mL⁻¹, que reduziu a síntese de β -1,3 glucanase com o aumento da concentração, o contrário foi observado para o EAR. Os menores picos foram observados para o EEC e EDC, indicando que tanto o solvente quanto a forma de extrato e partes da planta utilizada podem interferir na obtenção de moléculas elicitoras da síntese de β -1,3-glucanase (Tabela 3). A atividade dessa enzima está relacionada ao sistema de defesa da planta, a qual é capaz de hidrolisar as ligações β -1,3 das glucanas da parede dos fungos (RODRIGUES et al., 2006). No presente estudo, foi possível observar a relação inversa entre a menor AACPD no tratamento com EAC na concentração 0,5 mg.mL⁻¹ e maior ativação das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase antes da infecção pelo patógeno, as quais foram eficientes no controle da doença. O aumento da resistência em plantas de batata da cultivar Diamante foi relacionado ao aumento dos níveis de β -1,3-glucanase, refletindo na redução dos sintomas da Pinta preta causada por *A. solani* (SHAHBAZI et al., 2011).

Pereira et al. (2008) observaram que plantas pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculadas com *Verticilliumdahliae*(Kleb), apresentaram maior pico de peroxidase após oito dias e menor aos 18 dias em relação a testemunha, a qual apresentou maior pico dessa enzima aos 18 dias. Entretanto o ASM reduziu significativamente à murcha-de-verticílio em cacauero. Esses dados revelam que quanto antes houver indução de enzimas de resistência, maior será sua resposta na redução da severidade da doença.

Pode-se concluir que o extrato bruto de *M. tenuiflora* possui ação direta contra *A. cucumerina*, se comportando também como elicitor, induzindo a síntese de enzimas de resistência em plantas de me-

lancia. Essa dupla ação do extrato pode ser justificada por ser um produto composto por várias moléculas. Estudos realizados por Latha et al. (2009) também constataram a dupla ação do extrato de Zimmu (*Allium cepa* L. x *A. sativum* L.) em associação com *Pseudomonasfluorescens* (Migula) e *Bacillus subtilis* (Cohn) no controle da pinta-preta do tomateiro causada por *A. solani* (Ellis &G.Martin) L.R. Jones &Grout.

Em campo, os extratos reduziram a AACPD da mancha-de-alternária em relação à testemunha, apresentando significância pelo teste F a 5% de probabilidade entre os tratamentos e a testemunha, exceto para o tratamento com extrato aquoso de raiz 10 mg.mL⁻¹ que foi estatisticamente igual à testemunha. O EAC na concentração de 4 mg.mL⁻¹ controlou a doença em 31%, apresentando maior percentagem de controle entre os extratos. Enquanto, os controles, os fungicidas comerciais tebuconazol + trifloxistrobina e oxiclreto de cobre, controlaram 15 e 21% da severidade da mancha-de-alternária, respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 4).

As condições ambientais de temperatura e umidade relativa média durante a realização do experimento (26 °C e UR = 64%) foram favoráveis ao surgimento da doença. Ambiente favorável, hospedeiro susceptível e patógeno virulento são requisitos necessários ao surgimento de doenças. Sobre a influência dessas condições, as perdas da produção são reduzidas com medidas de controle químico, as quais aumentam os custos da produção, contaminam o ambiente e causa danos a saúde do homem.

Os extratos de *M. tenuiflora* mostraram-se eficientes na redução da mancha-de-alternária, inclusive mostrando-se superior aos fungicidas comerciais de referência, mesmo sob condições favoráveis a doença. Essa medida pode reduzir os custos de produção, além de fornecer produtos livres de contaminantes químicos e mitigar os impactos desses ao homem e ao ambiente.

Tabela 4. Controle da mancha-de-alternaria no campo em função de extratos de *Mimosa tenuiflora* em melancia cultivar pérola.

Extratos (E)	Concentração (mg.mL ⁻¹)			
	4	10	4	10
	AACPD		Controle (%)	
¹ EAC	462,5 b	498,5 b	31	27
² EEC	509,5 b	520,5 b	24	22,5
³ EDC	480 b	559 b	28,5	16,8
⁴ EAR	520,5 b	745 a	22,5	-11
Oxicloreto de Cobre	528,75 b		21	
Tebuconazol + Trifloxistrobina	571,5 b		15	
Testemunha	671,75 a			
CV (%)	18,9			

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. (AACPD) Área abaixo da curva de progresso da doença. ¹Extrato aquoso da casca; ²Extrato etanólico da casca; ³Extrato decócto da casca e ⁴Extrato aquoso da casca de raiz.

CONCLUSÃO

Os extratos aquosos da casca do caule de *Mimosa tenuiflora* (jurema preta) mostraram-se eficientes no controle da mancha-de-alternaria da melancia, em ambiente controlado, tanto pela ação antimicrobiana dos extratos quanto pela indução de enzimas de resistência e em condições de campo, podendo ser uma alternativa ao controle de doenças na agricultura orgânica ou no manejo com outros produtos.

REFERÊNCIAS

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - I. avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, 2006a.

BALBI-PEÑA, M. I. et al. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação *in vivo*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006b.

BEZERRA, D. A. C. et al. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadeniastipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 99-106, 2011.

BINDSCHEDLER, L. V. et al. Peroxidase-dependent apoptotic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. **The Plant Journal**, [Nova Jersey]: Wiley, v. 47, n. 6, p. 851-863, 2006.

BRITO, N. M. et al. ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE Chalaraparadoxa NA PÓS-COLHEITA DE ABACAXI. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 2, p. 52-58, 2011.

CHITARRA, G. S. et al. Germination of Penicil-

liumpaneum conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 5, p. 2823-2829, 2004.

GUIMARÃES, L. M. P. et al. Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana-de-açúcar parasitada por *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 11-15, 2010.

GUIMARAES-BEELLEN, P. M. et al. 2006. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 46-50, 2006.

ITAKO, A. T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 241-244, 2008.

ITAKO, A. T. et al. CONTROLE DE *CLADOSPORIUM FULVUM* EM TOMATEIRO POR EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 75-83, 2009.

LATHA, P. et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, [Amsterdam]: Elsevier, v. 50, n. 2, p. 85-93, 2009.

- MARAZO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.
- McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 5, p. 195-217, 1923.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2 ed. Recife: Imprensa Universitária, 2004. 183 p.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U.P de. ARAÚJO, E de L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- PEREIRA, R. B. et al. Ativação de defesa em cacau-eiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 171-178, 2008.
- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA, N. E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- ROTEM, J.; BASHI, E. INDUCTION OF SPORULATION OF *ALTERNARIA PORRI* F. SP. *SOLANI* BY INHIBITION OF ITS VEGETATIVE DEVELOPMENT. **Transactions British Mycological Society**, Great Britain, v.53, n. 3 p. 433-439, 1969.
- SENHOR, R. F. et al. EFICIÊNCIA DE DIFERENTES FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *ALTERNARIA ALTERNATA*, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO PÓS-COLHEITA EM FRUTOS DE MELOEIRO. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 14-19, 2009.
- SHAHBAZI, H. et al. Activity of β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase in two potato cultivars following challenge by the fungal pathogen *Alternaria solani*. **Phytoparasitica**, [New York]: Springer, v. 39, n. 5, p. 455-460, 2011.
- SHAHBAZI, H. et al. Biochemical Evaluation of Resistance Responses of Potato to Different Isolates of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, [Minnesota]: The American Phytopathological Society, v. 100, n. 5, p. 454-459, 2010.
- SHANER, G.; FINEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, [Minnesota]: The American Phytopathological Society, v.67, p.1051-1056, 1977.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.
- VEIGA, M. M et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.
- VIGO-SCHULTZ, S. C. et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* sp. *campestris*) em couve-flor. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 515-524, 2006.