

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GABRIELLI CRISTINI MAIA

**Desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* em diferentes concentrações
de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

GABRIELLI CRISTINI MAIA

**Desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* em diferentes concentrações
de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação do Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni.

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M217d Maia, Gabrielli Cristini

Desenvolvimento in vitro de *Sclerotium rolfsii* em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar / Gabrielli Cristini Maia -- Dourados: UFGD, 2016.

23f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Walber Luiz Gavassoni

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. *Saccharum officinarum*. 2. crescimento micelial. 3. murcha de *sclerotium*.

I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

GABRIELLI CRISTINI MAIA

Desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfii* em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formadora:

Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni (Presidente)

Prof. Dr. Gisele Jane Jesus

Msc. Suelen Pieta

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2016**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walber Luis Gavassoni, pela orientação, pela disposição em esclarecer as dúvidas, pelo apoio, pelas críticas construtivas e pela confiança ao longo do período de pesquisa.

À mestranda Suelen Pieta pela orientação, parceria, ensinamentos e apoio.

A todos os colegas de laboratório do grupo FITOTROPA, em especial ao técnico Bruno Pontim, a Doutoranda Cassia de Carvalho, e ao mestrando Paulo Henrique Nascimento, pela disposição em ajudar e pelo convívio durante este período.

À toda minha família, ao meu pai Emerson Tiago e minha mãe Ana Cristina, meus irmãos Ana Beatriz e Rafael Tiago, por todo incentivo, suporte, apoio e amor, e em especial minha tia Solange Palomo, por me abrigar e cuidar de mim.

Aos meus amigos da Biotecnologia, por anos de companheirismo e principalmente paciência comigo, e as minhas amigas, por acreditarem que chegaria até o fim.

A todos os excelentes professores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais por todo o exemplo, conhecimento passado e auxílio necessário durante o período de graduação.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realização do curso de graduação em Biotecnologia.

A Atlética de Biotecnologia, pela oportunidade de aprendizado.

Agradeço a todos aqueles que aqui não foram nomeados, mas que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes ao meu desenvolvimento pessoal.

À Deus pela existência de tudo e de todos.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	5
4. CONCLUSÕES	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

Desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar

RESUMO

O uso excessivo de fungicidas, pode ocasionar o aparecimento de organismos resistentes, devido a isso compostos naturais de plantas tem sido pesquisado como opção no controle de doenças. O trabalho teve como objetivo, avaliar a eficácia do extrato pirolenhoso (EP) de cana-de-açúcar em diferentes concentrações no desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. Foram testadas seis concentrações do extrato (0; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 ppm) em discos de micélio e escleródios. As avaliações consistiram em medições diárias do diâmetro das colônias fúngicas. Foram avaliados índice de velocidade de crescimento micelial, o crescimento médio micelial e a inibição do crescimento fúngico. *Sclerotium rolfsii* desenvolveu-se em todas as concentrações testadas, entretanto 5000 ppm ocorreu menor desenvolvimento. Conclui-se que a dose mais eficaz para inibir o desenvolvimento do fungo foi na concentração de 5000 ppm.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, crescimento micelial, murcha de sclerotium

***In vitro* development of *Sclerotium rolfsii* in different pyroligneous extract
concentrations of sugarcane**

ABSTRACT

Resistance to fungicides has become a major issue in plant disease management, and several options to the current available commercial products have been studied. In this study evaluate the *in vitro* effect of the sugarcane pyroligneous extract on the mycelial growth of the fungus *Sclerotium rolfsii* was evaluated. Six extract concentrations (0; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 ppm), were tested against mycelial disks and sclerotia. Evaluations consisted in daily measurements of mycelial growth diameter. The mycelial growth index, mycelial growth average and growth inhibition rate were calculated. *Sclerotium rolfsii* developed in all concentrations except under 5000 ppm. It concludes that the most effective dose to inhibit fungal growth was at a concentration of 5000 ppm.

Key-words: *Saccharum officinarum*, mycelial growth, wilting sclerotium

1. INTRODUÇÃO

Dentre os métodos de manejo de doenças de plantas, destacam-se o uso de fungicidas devido ao resultado imediato e eficiência de controle. Contudo, o uso inadequado destes produtos, pode ocasionar o aparecimento de organismos resistentes, além, de degradar solo e água e, reduzir a biodiversidade. Este fato, tem gerado preocupação e impulsionado o estudo de novas alternativas de controle, de modo, a garantir um controle eficiente e que ao mesmo tempo minimize os impactos ambientais (COUTINHO, 1996).

Produtos derivados de recursos naturais renováveis têm sido de suma importância para o desenvolvimento da agricultura sustentável ou alternativa, já que podem mitigar danos ao meio ambiente, como por exemplo, a utilização de extratos orgânicos como nova medida de proteção das plantas contra as doenças (RODRIGUES, 2006).

De acordo com Venturoso (2009), a procura de fungicidas obtidos de compostos naturais de plantas tem aumentado. Tem se constatado na literatura, pesquisas *in vitro* demonstrando que diversos patógenos podem ser controlados com eficiência por meio de extratos vegetais, como *Fusarium proliferatum* por extratos de alho e capim-santo (SOUZA et al., 2007), *Colletotrichum gloeosporioides* por extratos de melão de são caetano e eucalipto (CELOTO et al., 2008) e *Bipolaris sorokiniana* por extrato de cânfora (FRANZENER et al., 2003).

Neste contexto, vem sendo pesquisada a utilização de extrato pirolenhoso na agricultura, especificamente no controle de pragas e doenças de plantas (SOUZA-SILVA et al., 2006). O extrato pirolenhoso ou ácido pirolenhoso é um subproduto orgânico aquoso de cor amarela à marrom avermelhada, gerado durante o processo de carbonização da madeira ou de diferentes materiais vegetais, sendo constituído de 80% de água e o restante de sua composição por compostos orgânicos, dentre eles ácido acético, álcoois, cetonas e fenóis (ZANETTI, 2005). Por conter alcatrão solúvel, o extrato pirolenhoso bruto não pode ser utilizado na agricultura, e precisa ser destilado ou decantado para a obtenção do produto purificado, sem a presença de alcatrão, pois este contém componentes cancerígenos (CAMPOS, 2007).

Segundo Saigusa (2002), o efeito ativador ou inibidor do EP sobre os organismos vivos depende de sua concentração, e a eficiência do produto está relacionado com a matéria prima vegetal utilizada na queima, o método de obtenção do extrato e o preparo das soluções.

Lorenzetti et al. (2012) desenvolveram experimentos conduzidos *in vitro* e em condições de campo, onde avaliaram produtos naturais em diferentes concentrações no controle da ferrugem das folhas do capim-limão, e constataram que *in vitro* o extrato pirolenhoso de

eucalipto, nas duas maiores concentrações (40 e 50 g L⁻¹) utilizadas inibiram 100% a germinação dos urediniosporos do patógeno *Puccinia nakanishikii*. Entretanto, a campo o extrato não demonstrou um controle efetivo da doença.

Dentre os inúmeros fungos que causam doenças de plantas, destaca-se o *Sclerotium rolfsii*, que produz numerosos e diminutos escleródios com uma camada exterior melanizada, e seu interior contendo hifas enoveladas. O patógeno é responsável pelo tombamento de mudas, murcha de sclerotium, cancro da haste, podridão de raiz e colo, culminando a morte da planta, e afetando a redução da produtividade de diversas espécies de cultivo, como culturas folhosas, raízes, bulbos, tubérculos e frutos (AGRIOS, 2005).

Existem poucos fungicidas registrados no controle da doença, sendo inexistente para a maioria das culturas agrícolas, e a literatura é escassa no estudo do uso de compostos naturais para o controle, o que dificulta o manejo da doença (AGROFIT, 2016).

Dessa forma, o trabalho teve como objetivo, avaliar a eficácia do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar em diferentes concentrações no desenvolvimento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

Dois experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da UFGD – MS, entre os meses de março a abril de 2016. Avaliou-se o efeito inibitório do extrato pirolenhoso na inibição no crescimento de *S. rolfsii*, foram realizados dois experimentos, em delineamento inteiramente casualizados com seis tratamentos e seis repetições, tendo como principal fator de estudo, o estado fisiológico do fungo e a concentração do extrato.

2.2. Obtenção do extrato pirolenhoso

O extrato pirolenhoso foi obtido da carbonização da cana-de-açúcar e cedido pela empresa Bioware tecnologia, Campinas-SP

2.3. Origem dos escleródios

Os escleródios utilizados nos ensaios foram coletados da cultura de mandioca salsa, no Horto de Produção e Pós-Colheita de Plantas Olerícolas da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados - FCA/UFGD em fevereiro de 2016 e foram armazenados na micoteca do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia.

2.4. Obtenção dos discos de micélio

Inicialmente os escleródios passaram por assepsia em álcool 70%, água destilada, hipoclorito de sódio 1% e água destilada novamente por um minuto em cada recipiente e foram multiplicados em placas de Petri descartáveis e estéreis, contendo 10 mL do meio de cultura batata-dextrose ágar (BDA) para obtenção da germinação miceliogênica.

2.5. Condução do experimento

Foram testadas diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar sobre o desenvolvimento *in vitro* do *S. rolfsii*. As concentrações testadas foram 1000, 2000, 3000,

4000 e 5000 ppm e o tratamento testemunha (0 – sem adição de extrato). Em um experimento o fungo foi repicado para as unidades experimentais na forma de disco de micélio e em outro experimento foram plaqueados ao centro da placa escleródios assepsiados. Os discos de micélio utilizados apresentavam 3 dias de incubação e foram retirados das bordas das placas. Em seguida, foram incubadas em câmara de crescimento do tipo BOD a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas 24 horas após o início da incubação até a colônia fúngica atingir a borda da placa.

Para ambos experimentos foram utilizadas 6 repetições e utilizou-se apenas um disco de micélio de 10 mm ou um escleródio por repetição.

2.6. Avaliações

Após 24 horas da incubação, as placas foram avaliadas medindo-se diariamente o diâmetro da colônia fúngica (média de duas medidas diametralmente opostas na placa), com auxílio de um paquímetro digital, durante 4 dias. A partir dos resultados obtidos foram avaliadas o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), o crescimento micelial médio por diâmetro e a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC).

O IVCM foi medido segundo Nechet (1999) e estimado utilizando-se a fórmula apresentada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{(D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial.

D=diâmetro médio atual da colônia.

Da=diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N=número de dias após a inoculação.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), foi aplicada a fórmula:

$$PIC = \frac{\text{Cresc. testemunha} - \text{Cresc. tratamento}}{\text{Cresc. testemunha}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o uso do programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014), e os dados foram submetidos a análises de regressão polinomial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Velocidade do crescimento micelial *in vitro*

Entre as concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar avaliadas para o desenvolvimento de colônias a partir de discos de micélio de *S. rolfsii*, as concentrações de 4000 e 5000 ppm (partes por milhão) promoveram uma diminuição significativa da velocidade do crescimento micelial do fungo, sendo verificado uma relação inversa, proporcional ao aumento da concentração do extrato, obtendo resultados de menores desenvolvimento em relação a testemunha. A testemunha e a concentração de 1000 ppm apresentaram uma velocidade de crescimento rápida, e as concentrações de 2000 e 3000 ppm apresentaram velocidades de crescimento intermediárias entre a maior concentração e a testemunha. Por fim, a concentração de 5000 ppm apresentou a menor velocidade de crescimento micelial (Figura 1).

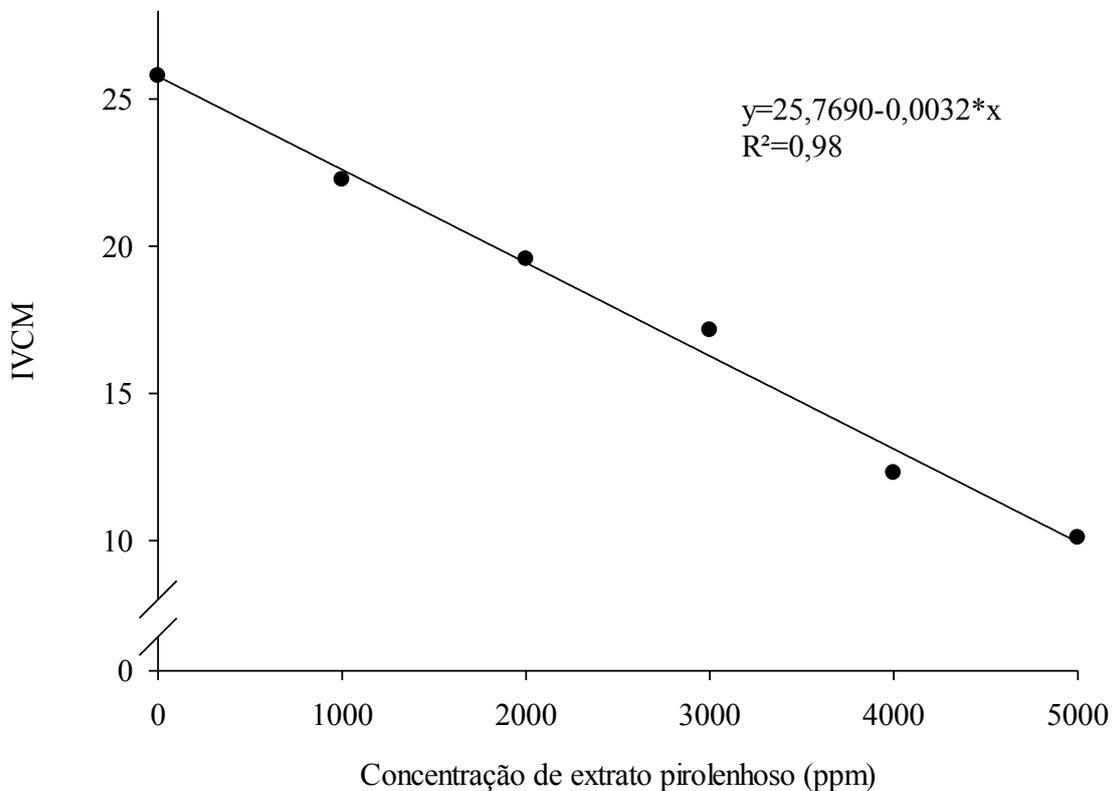


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do desenvolvimento *in vitro* de colônias a partir de discos de micélio de *S. rolfsii* em meio BDA na presença de diferentes

concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar durante 120 horas, Dourados-MS, 2016.

Similarmente aos resultados do experimento anterior, o índice de velocidade de crescimento micelial do ensaio *in vitro* do desenvolvimento de escleródio de *S. rolfsii*, notou-se que em concentrações de 4000 e 5000 ppm o fungo apresentou uma diminuição significativa da velocidade, nas demais concentrações o fungo obteve crescimentos rápidos e/ou intermediários em relação a maior concentração, também havendo uma relação inversa entre a concentração e o IVCM (Figura 2).

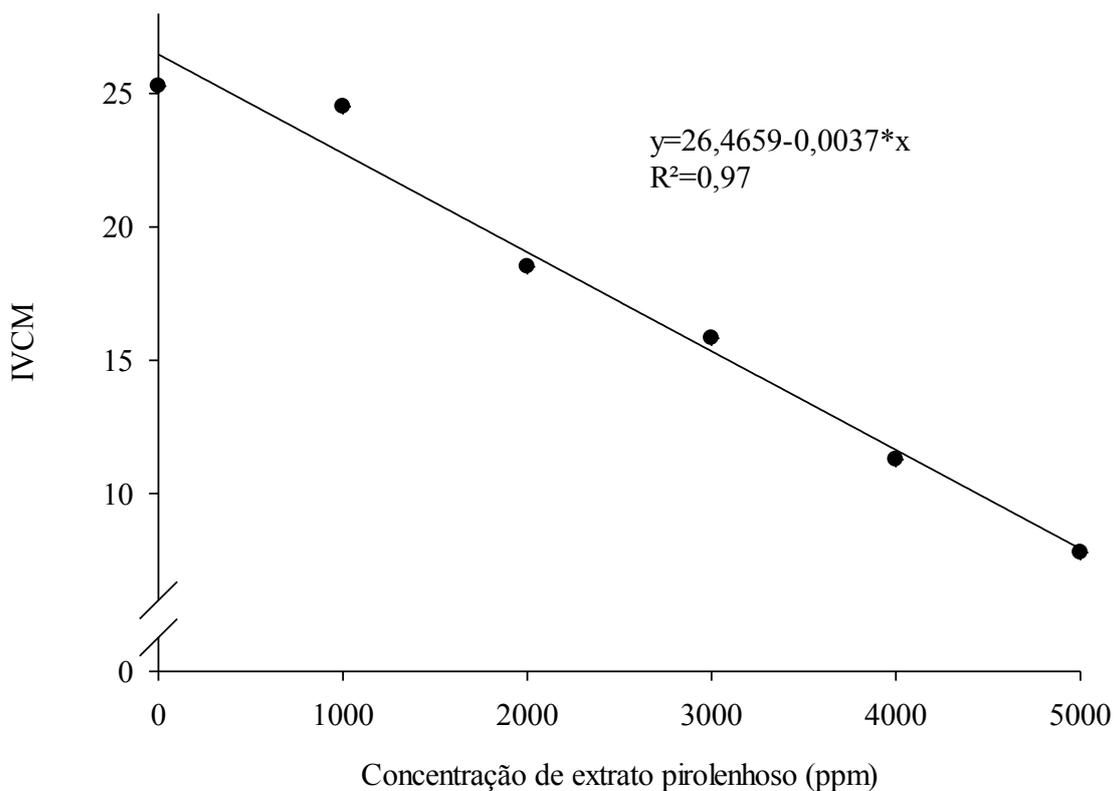


Figura 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do desenvolvimento *in vitro* de colônias a partir dos escleródios de *S. rolfsii* em meio BDA na presença de diferentes concentrações do extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar durante 120 horas, Dourados-MS, 2016.

Donde et al. (2013) avaliando extratos vegetais de alho, gengibre, pimenta e licor pirolenhoso no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. *in vitro* observaram que o índice de velocidade de crescimento micelial médio foi maior para dose 0 e menor para a dose 2mL (maior dose) ou seja, uma redução significativa na velocidade de crescimento micelial quando aumenta a dose.

3.2. Crescimento micelial

A avaliação foi realizada por 4 dias através da medição diária do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas na placa). No primeiro dia de avaliação as placas contendo o disco de micélio do fungo em todas as concentrações testadas apresentavam crescimento micelial exceto na concentração de 5000 ppm, onde *S. rolfsii* teve o seu desenvolvimento totalmente suprimido. A partir do segundo dia, o crescimento ocorreu em todas as concentrações, apresentando-se menor desenvolvimento nas maiores doses do extrato (4000 e 5000 ppm) quando comparada a testemunha. Na concentração de 5000 ppm o extrato teve ação fungistática, ou seja, dificultou o desenvolvimento do fungo (Figura 3). O aspecto geral do crescimento micelial diário do disco de micélio de *S. rolfsii* obtido em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso pode ser observado na Figura 4.

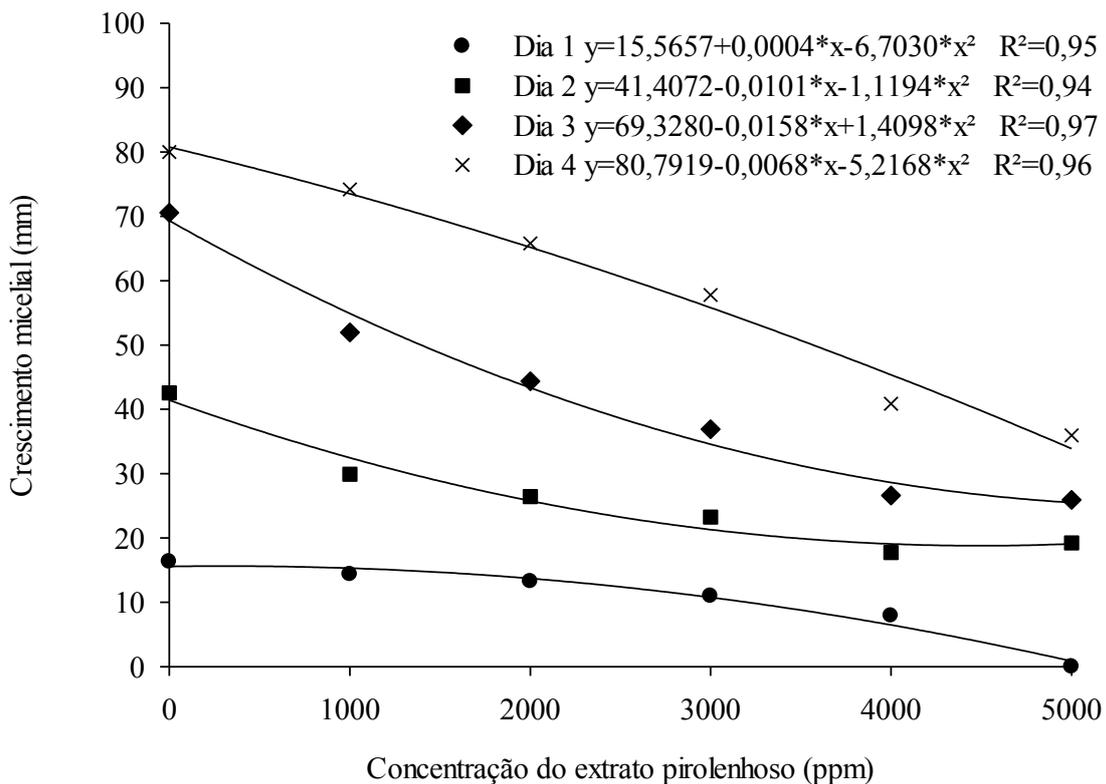


Figura 3. Crescimento micelial de colônias a partir de discos de micélio do fitopatôgeno *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar. As linhas representam as médias do crescimento dos 4 dias, Dourados-MS, 2016.

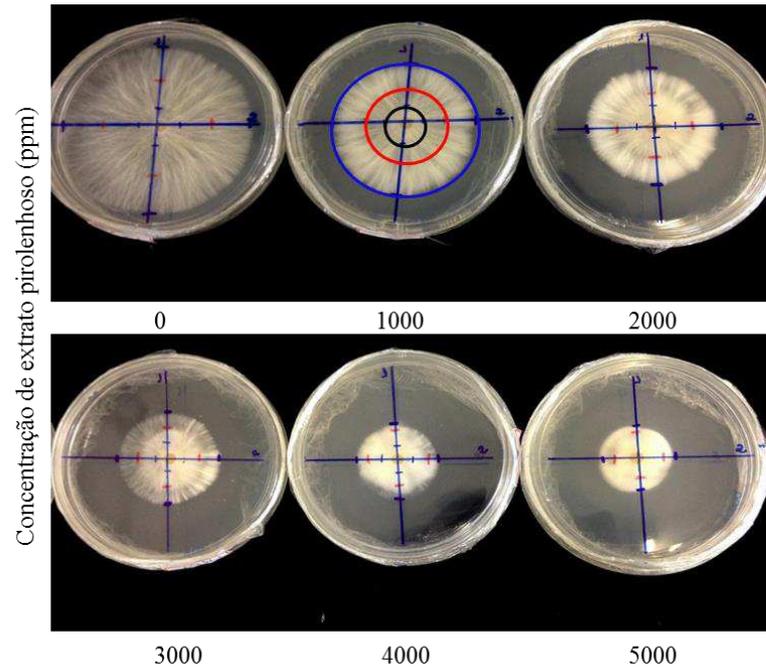


Figura 4. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* de colônias a partir de discos de micélio de *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso, onde a circunferência preta representa o crescimento no primeiro dia de avaliação, a vermelha no segundo e a azul no terceiro, Dourados-MS, 2016.

No segundo experimento, avaliando o desenvolvimento de colônias a partir de escleródios, igualmente ao resultado anterior observou-se que na concentração de 5000 ppm não houve crescimento micelial no primeiro dia de avaliação. Nos demais dias de avaliação o crescimento aconteceu em todas as concentrações, porém nas maiores doses do extrato o crescimento foi menor, e verificou-se que a dose de 5000 ppm teve ação fungistática, ou seja, dificultou o desenvolvimento do fungo (Figura 5). O aspecto geral do crescimento micelial diário do disco de micélio de *S. rolfsii* obtidos em diferentes concentrações de extrato pirolenhoso pode ser observado na Figura 6.

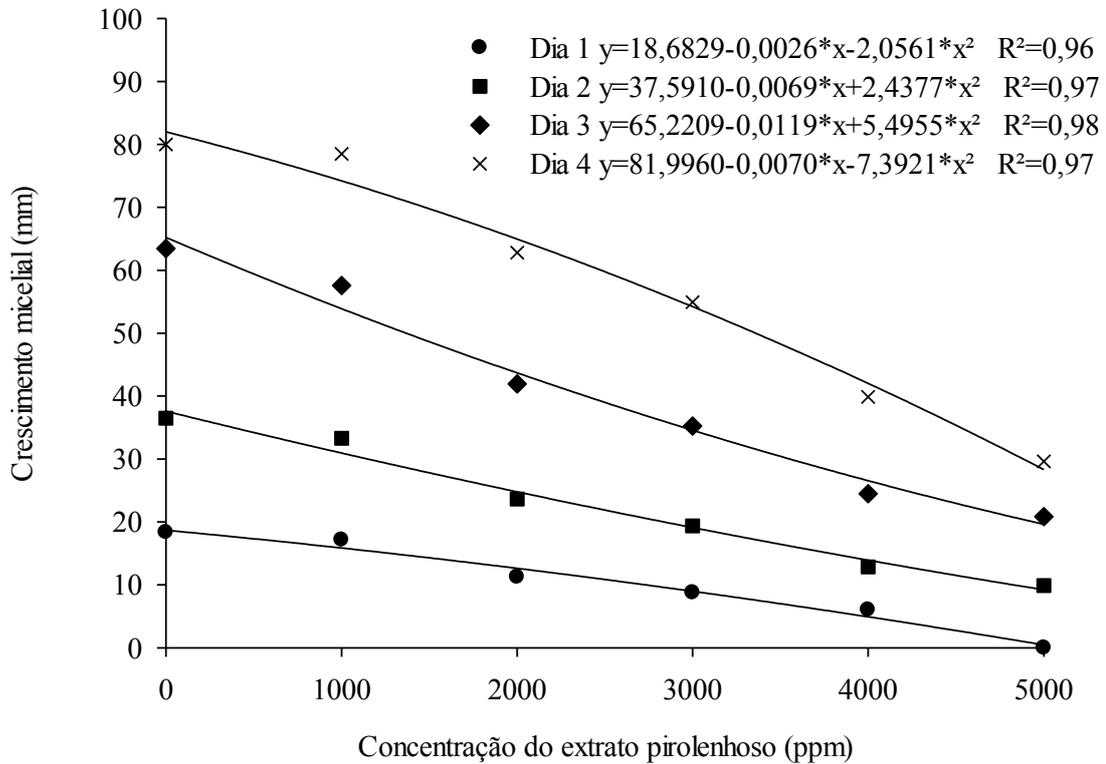


Figura 5. Crescimento micelial de colônias a partir de escleródios do fitopatógeno *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar. As linhas representam as médias do crescimento dos 4 dias, Dourados-MS, 2016.

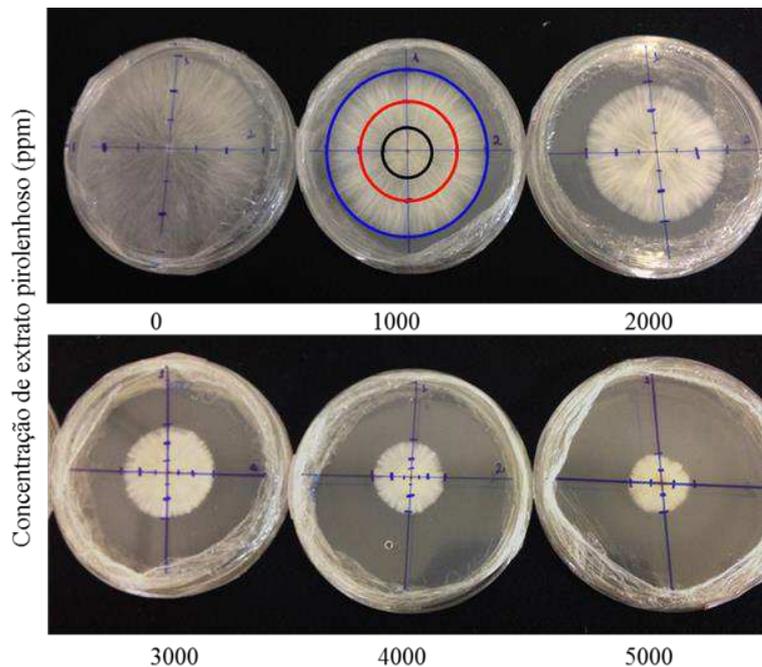


Figura 6. Aspecto geral do crescimento micelial *in vitro* de colônias a partir de escleródios de *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso, onde a circunferência preta representa o crescimento no primeiro dia de avaliação, a vermelha no segundo e a azul no terceiro, Dourados-MS, 2016.

Os resultados verificados neste experimento para a taxa de crescimento micelial diferem do encontrado por Mello et al. (2005) que trabalhando *in vitro* com extrato pirolenhoso no controle de *Sclerotinia Sclerotiorum* verificaram que a aplicação do extrato não se mostrou efetiva, permitindo o desenvolvimento micelial e a produção de escleródios do fungo semelhante ao controle positivo (sem adição de extrato).

3.3. Inibição de crescimento

O efeito inibitório de diferentes concentrações do extrato pirolenhoso sobre colônias a partir do disco de micélio de *S. rolfsii* está representado na Figura 7. Observou-se que a concentração de 5000 ppm do extrato pirolenhoso nas 48 horas promoveu 100% de inibição de crescimento do micélio do fungo. Nas concentrações de 4000 e 3000 ppm a inibição foi mais efetiva a partir de 96 horas, sendo de 62% e 50% respectivamente. Na concentração de 2000 ppm a inibição ocorreu a partir de 72 horas, sendo 37%. Na concentração de 1000 ppm em todos os períodos avaliados houve uma inibição do crescimento menor em relação às demais concentrações, porém em todas as concentrações a avaliação de 120 horas o efeito de inibição de crescimento micelial perde a eficiência comparada com as avaliações anteriores.

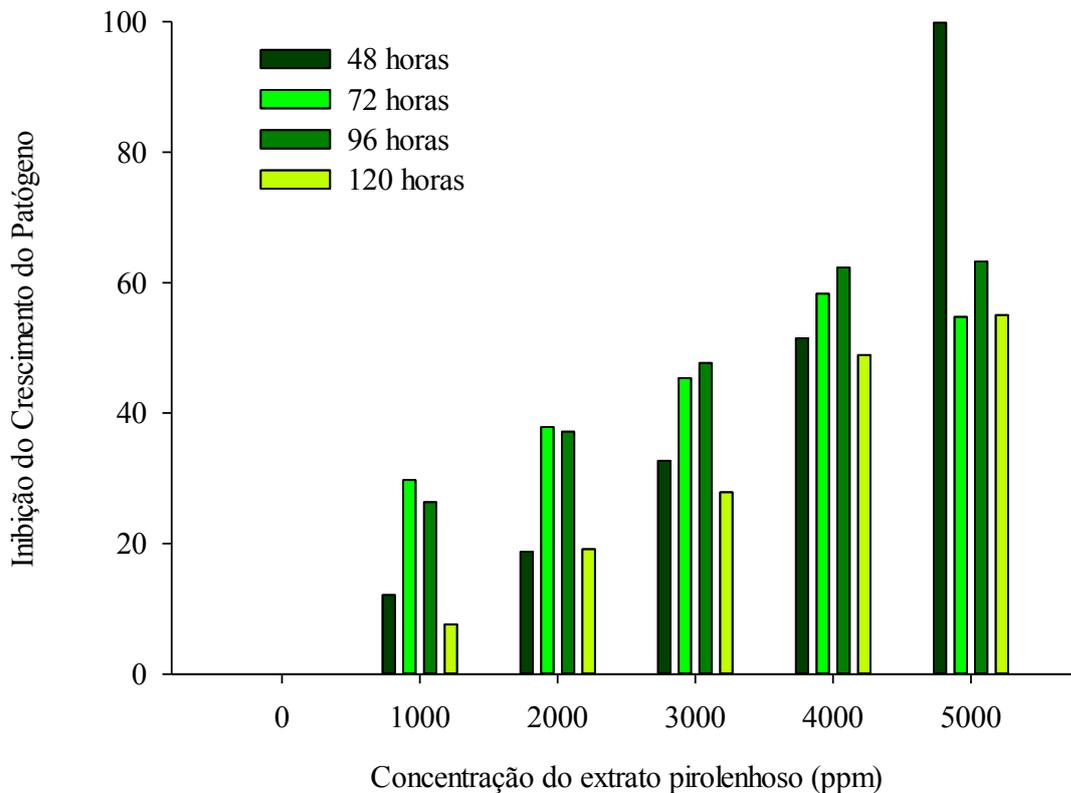


Figura 7. Inibição do crescimento micelial de colônias a partir de discos de micélio do fitopatógeno *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso. As barras representam as horas em que as placas foram avaliadas. Dourados-MS, 2016.

A inibição do crescimento micelial de colônias a partir do escleródio foi semelhante a do disco de micélio, na primeira hora avaliada (48 horas) a concentração inibitória total encontrada foi de 5000 ppm de extrato, nas concentrações de 4000, 3000 e 2000 ppm a inibição do crescimento do fitopatógeno foi de 68%, 53% e 39% respectivamente. A partir de 72 horas houve um declínio na inibição do crescimento micelial em todas as doses, exceto a concentração de 1000 onde houve maior inibição de crescimento do micélio sendo de 30%. Porém em todas as concentrações após atingirem o pico de inibição, elas perdem a eficiência (Figura 8).

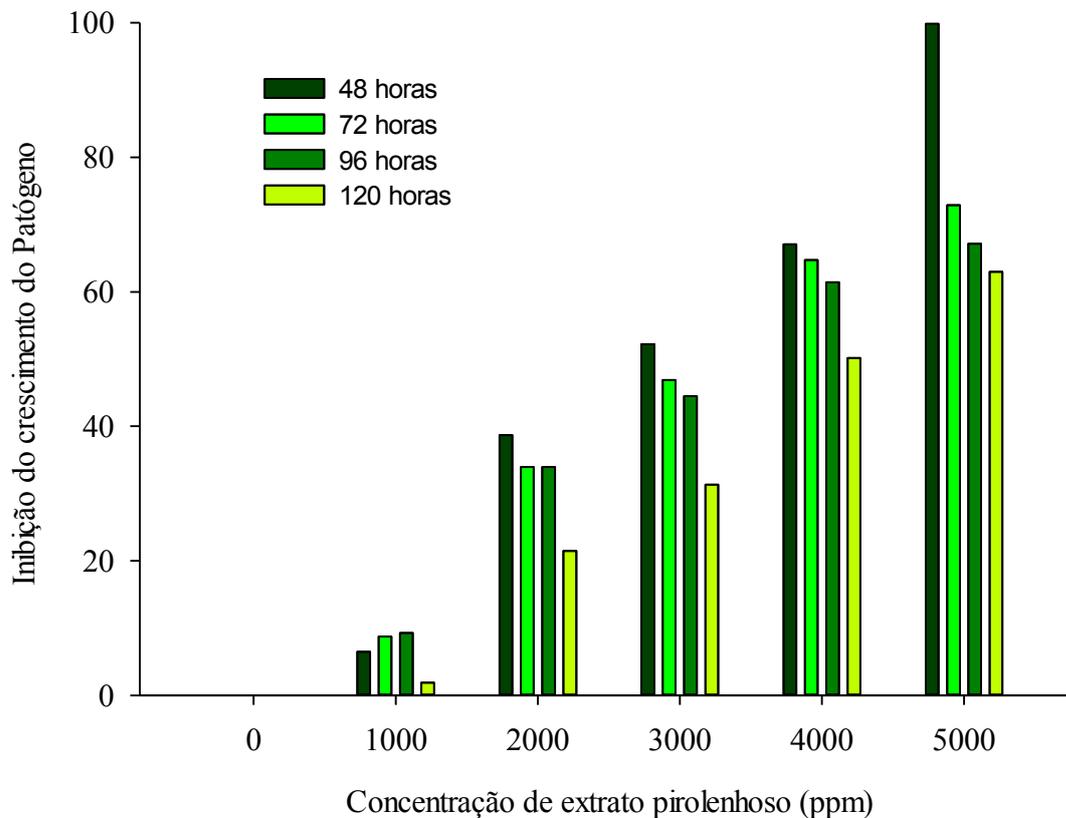


Figura 8. Inibição do crescimento micelial de colônias a partir de escleródios do fitopatógeno *S. rolfsii* na presença de diferentes concentrações de extrato pirolenhoso. As barras representam as horas em que as placas foram avaliadas.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Bonaldo et al. (2007) onde os autores trabalharam com o extrato bruto de eucalipto (*E. citriodora*) sobre os fungos *Rhizoctomia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum sublineolum*, *Phytophthora* sp e *Alternaria alternata*, onde verificaram que a partir de 20% da concentração do extrato bruto, todos os fungos apresentaram inibição do crescimento micelial, e que para *S. rolfsii* a concentração de 20 μ L houve 100% de inibição do crescimento micelial. Calleros et al. (2000) relataram que extrato purificado de afinina e extrato bruto das raízes de *Heliopsis longipes* na concentração mais elevada inibiram completamente o desenvolvimento micelial de *S. rolfsii* e *S. cepivorum*. Schwan- Strada et al. (2000) avaliando o efeito do óleo essencial de manjeriço (*O. basilicum*), de arruda (*R. graveolens*) e de carqueja (*B. trimera*) sobre crescimento micelial de *S. rolfsii*, *in vitro* verificaram que a presença de óleo de manjeriço e arruda nas concentrações acima de 10% inibiram 100% o crescimento micelial de *S. rolfsii*.

De acordo com os experimentos realizados esses resultados podem ter sido influenciados pela presença de vários compostos presentes no extrato com ação antifúngica. Comparando tratamento-testemunha em ambos experimentos (disco de micélio e escleródio)

tiveram efeito significativo na concentração de 5000 ppm, onde ocorreu o menor IVCm, menor crescimento micelial e maior PIC.

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que em *Sclerotium rolfsii*, tanto para as colônias oriundas de discos de micélio quanto para escleródio, o extrato pirolenhoso de cana-de-açúcar a 4000 e 5000 ppm afetou negativamente o desenvolvimento do fungo.

A eficiência do extrato pirolenhoso de cana de açúcar depende de sua concentração, novos trabalhos devem ser realizados para testar maiores doses na inibição do desenvolvimento fúngico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5ª Ed., Elsevier Academic Press. 2005. 922p.
- ALVES, M. **Impactos da utilização de fino de carvão e extrato pirolenhoso na agricultura**. 2006. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2006.
- AGROFIT Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 15 junho. 2016.
- BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M.E.S.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.383-387, 2007.
- CALLEROS, G. V., TORRES, J. M., CHÁVEZ, E. R., & VALDEZ, L. L. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de Sclerotium. **Agrociencia**, v. 34, n. 2, p. 207-215, 2000.
- CAMPOS, A.D. **Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola**. Concórdia: Embrapa Clima Temperado, 2007. 8 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 65).
- CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.30, n.1, p.1-5, 2008.
- COUTINHO, H. L. C. Diversidade microbiana e desenvolvimento sustentável: diversidade microbiana e agricultura sustentável. In: WORKSHOP SOBRE BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, 1996, Campinas, SP
- DONDE, A. R., RODRIGUES, C., BAMBOLIM, A., DAVID, G. Q., & PERES, W. M. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp., **I seminário de biodiversidade e agroecossistemas amazônicos**, 2013.
- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, v.38, n.2, pp. 109-112. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>. Acesso em 20 de junho de 2016
- 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**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- LORENZETTI, E. R., et al. Controle da ferrugem das folhas do capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC:) Stapf] com produtos naturais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.571-578, 2012.

MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Alternative products in the *in vitro* inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.62, n.2, p.179-183, 2005.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annum L.*)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1991.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.1, p.123-127, 2006.

SAIGUSA, T. Aplicação de extrato pirolenhoso na agricultura (APAN – Associação dos produtores de Agricultura natural). 2002. **Apostila**.

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

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.465-471, 2007.

SOUZA-SILVA, A.; ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; MENDONÇA, L. A. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. **Cerne**, Lavras, v.12, n.1, p.19- 26, 2006.

VENTUROSOSO, L. D. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja**. 2009. p.102. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Dourados, 2009.

ZANETTI, M; CAZETTA, J O; JÚNIOR MATTOS, D; CARVALHO, S A Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em limoeiro cravo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Pelotas, v.26, n.3, p.529-533, 2005.