



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO – UFPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JUCIARA CARNEIRO GOUVEIA TENÓRIO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO DESENVOLVIMENTO DE  
DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS**

Recife

2019

JUCIARA CARNEIRO GOUVEIA TENÓRIO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO DESENVOLVIMENTO DE  
DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

**Coorientador:** Dr. Alexandre Gomes da Silva

Recife

2019

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Tenório, Juciara Carneiro Gouveia

Avaliação de compostos bioativos no desenvolvimento de defensivos agrícolas naturais/ Juciara Carneiro Gouveia Tenório - 2019.

98 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Alexandre Gomes da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Recife, 2019.

Inclui referências

1. Controle de pragas 2. Produtos naturais 3. Indução de resistência  
I. Silva, Márcia Vanusa da (orient.) II. Silva, Alexandre Gomes da (coorient.) III. Título

363.78

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-009

JUCIARA CARNEIRO GOUVEIA TENÓRIO

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO DESENVOLVIMENTO DE  
DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em 27/02/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica – UFPE

---

Dr. Alexandre Gomes da Silva  
PNPD Departamento de Antibióticos - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva  
PNPD Departamento de Bioquímica - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

---

Dra. Clébia Maria Alves de Almeida  
Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Antônio Félix da Costa  
Pesquisador do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA

Aos meus filhos, Túllio, Thiago e Thaísa e às minhas netas, Sofia e Maya, minha razão de ser feliz.

Aos meus pais João Gouveia e Cleonice Carneiro, meu alicerce.

Ao meu esposo Valdomiro Tenório Alves, pela família linda que construímos.

A minha “tia-avó-madrinha” Olindina Carneiro Mergulhão (*in memoriam*).

Ao meu amigo e Coorientador Alexandre Gomes da Silva

A minha amiga e Orientadora Marcia Vanusa da Silva

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por iluminar meu caminhar de forma tão abençoada durante esses quatro anos e permitir essa conquista na minha vida;

Aos meus pais João Gouveia e Cleonice Carneiro, pelo carinho, amor, apoio e incentivo para que fosse possível essa vitória e também por compreender minhas ausências em vários momentos durante essa jornada;

Aos meus filhos Túllio e Thiago e a minha filha Thaísa, por todo carinho, apoio e compreensão das minhas ausências em muitos momentos.

Ao meu marido Valdomiro Tenório, obrigada pelo cuidado, atenção, carinho, incentivo, cumplicidade e parceria para a realização dessa vitória na minha vida profissional e pessoal;

À minha amiga Cássia Alzira, um anjo que em um momento difícil esteve ao meu lado, segurou a minha mão e me apresentou a Alexandre e a Profa. Marcia. Foi aí que tudo começou... Muito obrigada Cássia;

À minha orientadora Dra. Márcia Vanusa da Silva, ser humano iluminado e de um coração gigantesco. Muito obrigada pela atenção e carinho que me acolheu para orientar e pela amizade que construímos. Obrigada pela oportunidade, confiança, incentivo e auxílio em todas as etapas deste trabalho, obrigada por fazer parte da minha vida científica e pessoal;

Ao meu coorientador Dr. Alexandre Gomes da Silva, primeira pessoa que me acolheu no Departamento após situações angustiantes por mim vivenciadas. Agradeço imensamente pela orientação, acompanhamento, dedicação, disponibilidade, desde o projeto até a etapa final. Agradeço todo compartilhamento de conhecimentos e colaboração nos experimentos e, acima de tudo, a amizade e o respeito que construímos nessa caminhada. Obrigada meu amigo;

Ao Dr. Antônio Félix, amigo e ser humano de uma generosidade imensa, agradeço pela acolhida, orientação, disponibilidade para as orientações e parceria dos experimentos na casa de vegetação no Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA;

A Nazaré, funcionário do IPA, pelo auxílio e atenção durante os experimentos;

A Venézio, pesquisador do IPA pela atenção e disponibilidade de fazer as estatísticas;

À amiga parceira de pesquisa Vanessa Lira, pela disponibilidade, atenção e compartilhamento de conhecimento ao mundo dos nematoides. Obrigada amiga;

Ao Prof. Nicácio Henrique, pela atenção, disponibilidade e esclarecimentos sempre que necessários;

Agradeço imensamente a Sr. João, um técnico-professor, sempre disponível, auxiliando, orientando com muita dedicação o manuseio dos equipamentos, um ser humano muito gentil e atencioso;

A Dona Helena, pelo carinho e atenção, com seus doces e cafés;

A Thaíse, por compartilhar momentos de descontração e conhecimentos;

A Mônica Martins, pela amizade, ensinamentos e ajuda sempre que precisava;

A Bruno, técnico do laboratório, pelos auxílios, esclarecimentos e orientações no manuseio dos equipamentos e empréstimo do seu microscópio;

A Claudeana, pela disponibilidade e valiosa orientação e parceria nos experimentos na casa de vegetação;

Ao amigo Tiago Fonseca, pelo apoio, força, ajuda nos momentos necessários e as brincadeiras para descontração;

À amiga Cibele Bessa, pelo companheirismo, atenção, força, ajuda nos experimentos, conhecimentos compartilhados e pela amizade construída;

À amiga Paula Fernanda, agradeço por proporcionar momentos de amizade e aprendizagem, a cumplicidade durante esse período, a colaboração nos experimentos, o carinho, as brincadeiras e boas gargalhadas, o apoio nos momentos difíceis, disponibilidade pra ajudar sempre que solicitada, obrigada amiga;

À amiga Ana Paula Sant'Anna, a quem admiro e agradeço imensamente por tudo: amizade construída, o carinho, atenção, a ajuda em várias etapas da pesquisa, disponibilidade, orientação, ensinamentos diários, apoio espiritual, confiança.... Minha amiga, muito obrigada por fazer parte da minha história nesse plano;

A todos os funcionários, professores e amigos do Departamento de Bioquímica que ajudaram de certa forma no desenvolver desta tese;

A todos e todas do Laboratório de Produtos Naturais, muito obrigada.

*“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.*

*(AUTOR DESONHECIDO)*

## RESUMO

Em vista do crescente aumento da população mundial e da demanda na produção de alimentos, cresce também a preocupação em produzir um alto volume de alimentos sem perdas provenientes de ataques de pragas. O método mais utilizado para controle de pragas é o controle com defensivos químicos que são tóxicos ao meio ambiente e ao homem. Uma alternativa ao uso desses produtos são os insumos naturais que têm sua utilização desde a antiguidade. Os objetivos deste trabalho foram levantar os dados publicados na literatura sobre a utilização de produtos naturais (extratos vegetais e óleos essenciais) como ferramenta no controle alternativo ao fungo *Macrophomina phaseolina*; avaliar a utilização de extratos orgânicos da alga verde *Penicillus capitatus* no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas de importância na agricultura pernambucana; avaliar a indução de resistência pela expressão gênica, do extrato etanólico das folhas de *Allamanda blanchetii*, em plantas de *Sacharum officinale* (variedade SP-791011) suscetível ao fungo *Sporisorium scitamineum*. A revisão a cerca dos compostos naturais (extratos, óleos essenciais e/ou compostos purificados) no controle de *M. phaseolina* sistematizou um total de 59 espécies, distribuídas em 29 gêneros e 22 famílias, com Fabaceae (7), Asteraceae (5) e Lamiaceae (3) como táxons mais ricos. Os extratos orgânicos de *P. capitatus* foram sucessivamente extraídos com éter de petróleo, diclorometano, acetona e metanol, e ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para estudar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a seis linhagens bacterianas e seis fungos. A análise fitoquímica revelou a presença de flavonoides e triterpenoides e compostos fenólicos em todos os extratos. Os óleos voláteis estavam presentes apenas no extrato de ciclohexano, enquanto outros metabólitos, como alcaloides, esteroides, taninos, cumarinas e saponinas estavam ausentes. Para as bactérias fitopatogênicas, os melhores resultados foram apresentados pelo extrato de ciclohexano contra *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *malvacearum* e *X. campestris* pv *viticola*, enquanto *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentou maior resistência aos extratos orgânicos de *P. capitatus*. Para atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos, os melhores resultados foram apresentados com extrato de ciclohexano contra *Fusarium solani*, enquanto *Aspergillus flavus* apresentou maior resistência aos extratos orgânicos de *P. capitatus*. O efeito do extrato etanólico de *Allamanda blanchetii* na indução de mecanismo de resistência em uma variedade de cana-de-açúcar suscetível ao carvão foi avaliado pela expressão gênica. A análise fitoquímica para conhecer os principais compostos vegetais utilizados neste estudo

foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD). Flavonoides foram os compostos mais abundantes seguidos por terpenos, esteroides e saponinas. Em condições de estufa as plantas de cana-de-açúcar, SP-791011 (suscetível ao carvão), foram pulverizadas com extratos de *A. blanchetii* em concentrações de 1000 ppm e grupo controle com acilbenzolar-S-metil (ASM) (100mg/L). Folhas foram coletadas em 0, 24 e 48 horas após a pulverização e usadas na análise de RT-PCR para identificar a expressão do gene de defesa. Mudanças na expressão do gene foram observadas nos diferentes tratamentos. O extrato de *A. blanchetii* induziu um aumento na expressão da glucanase e foi mais efetivo que o indutor ASM. O gene SNPR1 apresentou aumento nos dois tratamentos. Os resultados indicam que o extrato etanólico de *A. blanchetii* foi capaz de ativar o mecanismo de resistência, como observado em plantas resistentes.

**Palavras-chave:** Controle alternativo de plantas. Indução de resistência. Produtos naturais. Biopesticidas.

## ABSTRACT

In view of the increasing world population and the demand for food production, there is also growing concern about producing a high volume of food without losses from pest attacks. The most commonly used method for pest control is control with chemical pesticides that are toxic to the environment and to humans. An alternative to the use of chemical pesticides are natural inputs that have been used for millennia of years. The objectives of this work were to collect data published in the literature using natural products (plant extracts and essential oils) as a tool in the alternative control to the fungus *Macrophomina phaseolina*; to evaluate the utilization of the green algae *Penicillus capitatus* in the control of fungi and phytopathogenic bacteria of importance in the agriculture of Pernambuco and to evaluate the induction of resistance, through the gene expression, of the ethanolic extract of the leaves of *Allamanda blanchetii*, in plants of *Sacharum officinale* SP-791011) susceptible to the fungus *Sporisorium scitamineum*. The review of the natural compounds (extracts, essential oils and / or purified compounds) in the control of *M. phaseolina* systematized a total of 59 species, distributed in 29 genera and 22 families, with Fabaceae (7), Asteraceae (5) and Lamiaceae (3) as richer taxa. The organic extracts of *P. capitatus* were successively extracted with petroleum ether, dichloromethane, acetone and methanol, and cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The broth microdilution method was used to study the antimicrobial activity of the extracts against six bacterial lines and six fungi. Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, triterpenoids and phenolic compounds in all extracts. Volatile oils were present only in the cyclohexane extract and other metabolites such as alkaloids, steroids, tannins, coumarins and saponins were absent. For phytopathogenic bacteria, the best results were presented by cyclohexane extract against *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *malvacearum* and *X. campestris* pv *viticola*, while *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* presented greater resistance to the organic extracts of *P. capitatus*. For antimicrobial activity against phytopathogenic fungi, the best results were presented with cyclohexanic extract against *Fusarium solani*, while *Aspergillus flavus* presented greater resistance to the organic extracts of *P. capitatus*. The effect of the ethanol extract of *Allamanda blanchetii* on the induction of resistance mechanisms in a variety of sugarcane susceptible to coal was evaluated through gene expression. The phytochemical analysis to know the main plant compounds used in this study was detected by thin layer chromatography (CCD). Flavonoids were the most abundant compounds followed by terpenes, steroids and saponins. In

greenhouse conditions, the sugarcane plants SP-791011 (susceptible to coal) were sprayed with *A. blanchetii* extracts at concentrations of 1000 ppm and acylbenzolar-S-methyl (ASM) (100 mg/L). Leaves were collected at 0, 24 and 48 hours after spraying and used in the RT-PCR analysis to identify expression of the defense gene. Changes in gene expression were observed in the different treatments. The extract of *A. blanchetii* induced an increase in glucanase expression and was more effective than the ASM inducer. The SNPR1 gene showed increase in both treatments. The results indicate that the ethanolic extract of *A. blanchetii* was able to activate the mechanism of resistance, as observed in resistant plants.

Keywords: Alternative pest control. Resistance induction. Natural products. Biopesticides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática das funções básicas em uma planta (esquerda) e dos tipos de interferência com essas funções (direita) causadas por alguns tipos comuns de doenças de plantas .....	20
Figura 2 –	O triângulo da doença .....	21
Figura 3 –	Tetraedro de doenças em plantas ou pirâmide de doenças .....	21
Figura 4 –	Morfologia e formas de multiplicação de alguns dos grupos de patógenos vegetais .....	22
Figura 5 –	Etapas no desenvolvimento de um ciclo de doença .....	23
Figura 6 –	Podridão mole da batata <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> .....	26
Figura 7 –	Planta de tomate com murcha-bacteriana, apresentando murcha generalizada (A) Teste do copo, mostrando exsudação de pus bacteriano em caule de tomateiro afetado pela murcha bacteriana (B) .....	27
Figura 8 –	Teste do copo, mostrando exsudação de pus bacteriano em caule de tomateiro afetado pela murcha bacteriana .....	28
Figura 9 –	Necroses foliares em forma de V .....	29
Figura 10 –	<i>Xanthomona citri</i> subsp. <i>malvacearum</i> em placa de Petri. A. colônias crescidas em meio de cultura com amido. B. Formação de halo translúcido ao redor das colônias, após adição de lugol .....	31
Figura 11 –	Chicote apical em touceira de cana-de açúcar infectada pelo fungo <i>Sporisorium scitamineum</i> .....	37
Figura 12 –	Quantitativo de agrotóxicos e afins comercializados no Brasil entre 2007 e 2014 .....	40
Figura 13 –	Agrotóxicos químicos mais comercializados no Brasil 2014 .....	41
Figura 14 –	Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabólitos secundários .....	44
Figura 15 –	Esquema do sistema de defesa da planta quando infectado por um patógeno .....	48
Figura 16 –	Mecanismos hipotéticos de ação dos extratos de algas sobre o controle (direto e indireto) de doenças .....	51

## LISTA DE TABELA

### Artigo 01

Tabela 1 – Antifungal activity of plant extracts and/or pure compounds against <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	64
---	----

### Artigo 02

Tabela 1 – Development systems and revealers used for analysis by thin-layer chromatography of secondary metabolites in <i>P. capitatus</i> extract .....	76
Tabela 2 – Classes of secondary metabolites present in the organic extracts of <i>Penicillus capitatos</i> .....	77

### Artigo 03

Tabela 1 – Primers sequence used to amplification of the PR genes and their respective annealing temperatures .....	81
Tabela 2 – Phytochemical profile of the organic extracts of the <i>A. blanchetti</i> leaves ...	81
Tabela 3 – Expression of proteins in sugarcane (smut-susceptible) genotype SP-791011 in response to induction with ASM (acilbenzolar-S-metil) and <i>A. blanchetti</i> extract at 0, 24, and 48 hours after induction .....	82

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	17
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
2.1	DOENÇAS EM PLANTAS.....	18
2.2	FITOPATOGÊNICOS.....	22
2.2.1	<b>Bactérias fitopatogênicas</b> .....	<b>24</b>
2.2.2	<b>Fungos fitopatogênicos</b> .....	<b>32</b>
2.3	CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS .....	39
2.3.1	<b>Controle Convencional</b> .....	<b>39</b>
2.3.2	<b>Controle Alternativo</b> .....	<b>41</b>
2.4	PRODUTOS NATURAIS.....	43
2.4.1	<b>Indução de resistência</b> .....	<b>45</b>
2.4.2	<b>Extratos de algas no controle de bactérias e fungos fitopatogênicos</b> .....	<b>51</b>
2.4.3	<b>Extratos de plantas no controle de bactérias e fungos fitopatogênicos</b> .....	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
3.1	Artigo 1 Natural products from plants: an environmentally friendly tool to control of <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid. (Botryosphaeriaceae) .....	61
3.2	Artigo 2 Phytochemical analysis and antiphytopathogenic activity of <i>Penicillus capitatus</i> lam. (Ulvophyceae; Udoteaceae) extracts against plant pathogenic microorganisms .....	72
3.3	Artigo 3. Extracts From Leaves of <i>Allamanda blanchetti</i> Inducing Mechanism of Defense to Diseases in Sugarcane .....	79
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos setores de maior destaque no Brasil, apresentando ampla variedade de espécies produzidas em todo o país, que possui diversas características edafoclimáticas e, assim, o torna um dos maiores produtores mundiais de produtos agrícolas. O segmento gera, aproximadamente, 5,6 milhões de empregos, em plantações que cobrem mais de 2 milhões de hectares, distribuídos por vários polos de produção no país. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas de China e Índia, o que mostra a relevância do setor para a economia brasileira (TREICHEL et al., 2016).

A agricultura representa cerca de 20% da balança comercial brasileira, ou seja, participa com aproximadamente 1 trilhão de reais do Produto Interno Bruto (PIB). Ademais, contribui com 41% das exportações do Brasil e emprega, direta e indiretamente, entre 25 e 30 milhões de pessoas, cerca de 30% da população economicamente ativa (MENTEN, 2014).

Um problema que afeta o agronegócio são as pragas e doenças, é um dos fatores que podem diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura. Essas doenças podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos, e nematoides fitopatogênicos, que muitas vezes se alastram pelas lavouras causando prejuízos de bilhões de reais. As pragas são responsáveis, em média, por cerca de 42,1% das perdas na produção agrícola. Estima-se que os fitopatógenos sejam responsáveis por 13,3% de danos, as plantas daninhas por 13,2%; e os insetos e ácaros por 15,6% (KREYCI, 2017).

No agronegócio, em todos os lugares do mundo, a intervenção para o controle de pragas e doenças é largamente realizada pelo uso de produtos químicos. O uso desses produtos pode ter, a curto prazo, um efeito positivo para o produtor, mas, a longo prazo, os resultados para a sociedade como um todo, para o meio ambiente e para o próprio produtor, podem se tornar negativos. Dessa forma, traz graves problemas para a saúde humana, animal, e sérias consequências para o meio ambiente, como a contaminação dos alimentos, solo, água e animais, geram resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos); o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A redução ou eliminação de produtos químicos no controle de pragas e doenças de plantas é uma necessidade econômica e ambiental. Na busca de controle alternativo, eficaz e menos danoso, observa-se o uso de extratos de plantas no combate a esses problemas. As plantas

produzem metabólitos para sua defesa contra os organismos fitopatogênicos, metabólitos esses que são objeto de pesquisa para formulação de defensivos agrícolas naturais. As vantagens relacionadas ao uso de extratos vegetais, devem-se ao fato de encontrar novos compostos, os quais os patógenos não se tornem resistentes, além de serem degradados rapidamente no ambiente, são menos tóxicos, derivados de recursos renováveis, possuem um amplo modo de ação e mantêm a produtividade e a qualidade dos produtos agrícolas (FERRAZ et al., 2008; JAMAL et al., 2008; PERREIRA, 2014; SILVA 2017).

A agricultura sustentável envolve o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a permitir satisfação das necessidades humanas atuais e futuras. A conscientização acerca dos problemas ambientais causados pelos agroquímicos e a busca pela redução de uso, controle de doenças, pragas e plantas invasoras têm levado a muitas pesquisas que visam a obtenção de tecnologias e produtos pouco tóxicos à natureza, vários deles já utilizados no passado de forma empírica no manejo fitossanitário (BETTIOL; MORANDI, 2009; RODRIGUES et al., 2006).

Diversos estudos têm apontado o potencial de uso dos extratos de algas como potenciais promissores para proteção vegetal. Sendo também relatado aumento da tolerância vegetal a estresses bióticos e abióticos. Estas pesquisas mostram que, mesmo em baixas concentrações, os produtos à base de extratos de algas apresentam atividade antimicrobiana, sugerindo que os derivados dos extratos possuem compostos bioativos (KHAN et al., 2009; CARVALHO et al., 2013, 2014).

O Brasil é o país responsável pela gestão do maior patrimônio de biodiversidade do mundo, contando com mais 46 mil espécies catalogadas da flora (MMA Flora do Brasil 2020). Na busca por compostos naturais utilizados como fontes alternativas ao emprego de antimicrobianos sintéticos as plantas e algas são alvos dessa investigação (RODRIGUES et al., 2006).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de compostos naturais no controle de bactérias, fungos fitopatogênicos, além de verificar o efeito do extrato etanólico das folhas de *Allamanda blanchetti* (Apocynaceae) na indução de resistência de cana-de-açúcar suscetível ao fungo *Sporisorium scitamineum*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar o estado da arte sobre a utilização de produtos naturais provenientes de plantas no controle de *Macrophomina phaseolina*;

Avaliar o potencial de extratos orgânicos da alga verde *Penicillus capitatus* no controle de bactérias e fungos fitopatogênicos;

Avaliar a indução de resistência, através da expressão gênica, do extrato aquoso das folhas de *Allamanda blanchetii* em plantas de *Sacharum officinale* (variedade SP-791011).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DOENÇAS EM PLANTAS

As doenças constituem sérios problemas para a agricultura desde a remota antiguidade. Entretanto existem divergências entre os fitopatologistas quanto à definição de “doenças em plantas”. O conflito fica em separar doença de uma simples injúria física ou química ou separar doença de praga ou de outros fatores que afetam negativamente o desenvolvimento das plantas (MICHEREFF, 2014). Para Agrios, (2005), a definição de doença é:

O mal funcionamento de células e tecidos do hospedeiro que resulta da sua contínua irritação por um agente patogênico ou fator ambiental e que conduz ao desenvolvimento de sintomas. Doença é uma condição envolvendo mudanças anormais na forma, fisiologia, integridade ou comportamento da planta. Tais mudanças podem resultar em dano parcial ou morte da planta ou de suas partes.

Para Gaümann (1946) “Doença de planta é um processo dinâmico, no qual hospedeiro e patógeno, em íntima relação com o ambiente, se influenciam mutuamente, do que resultam modificações morfológicas e fisiológicas”. Esta definição é mais aceita pelos fitopatologistas (MICHEREFF, 2014).

Segundo Michereff (2014), a diferença básica nas definições entre esses e outros autores consiste na possível causa da doença na planta, quanto à natureza. Algumas definições consideram ser decorrentes de agentes infecciosos, de natureza biótica, com capacidade de serem transmitidos de uma planta doente para uma planta sadia. Outras definições incluem causas de natureza abiótica, que não podem ser transmitidas de uma planta doente para uma planta sadia.

Seguindo a vertente de natureza não infecciosa, destacam-se as condições desfavoráveis do ambiente (temperatura excessivamente baixa ou alta, deficiência ou excesso de umidade, deficiência ou excesso de luz, deficiência de oxigênio, poluição do ar), as deficiências e/ou desequilíbrios nutricionais e o efeito de fatores químicos. Os agentes de natureza infecciosa incluem fungos, bactérias, vírus, nematoides, protozoários e plantas parasitas superiores. Apresentam extrema importância para o homem devido aos danos causados diretamente às plantas e aos seus produtos, bem como por influenciarem direta ou indiretamente na rentabilidade do empreendimento agrícola (MICHEREFF, 2014).

No novo texto da Convenção Internacional para Proteção de Plantas (CIPP 2006), pragas e doenças devem ser consideradas, conjuntamente, como pragas. O conceito oficial de

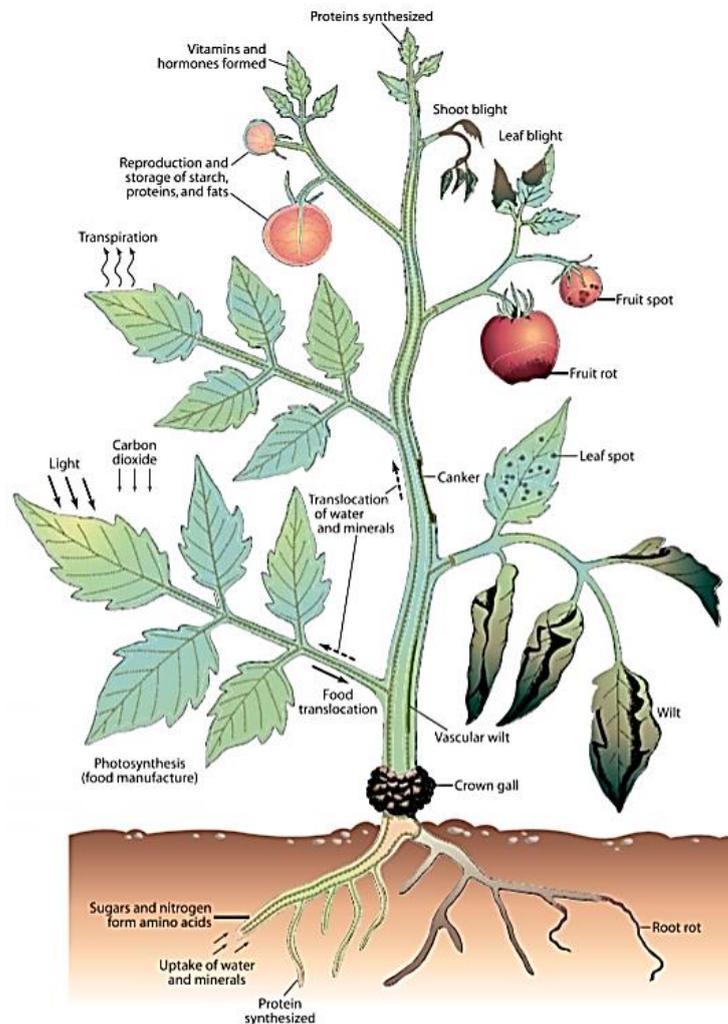
praga então estabelecido fica sendo: “qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais”, compreendendo animais (insetos, ácaros e nematoides) e doenças (causadas por fungos, bactérias, vírus e viroides) (CAROLLO; SANTOS FILHO, 2016).

Os agentes bióticos causam sérios danos na agricultura podendo debilitar o hospedeiro por absorção de nutrientes da célula hospedeira; causar distúrbios no metabolismo da célula hospedeira através de toxinas, enzimas ou substâncias reguladoras de crescimento por eles secretados; bloquear o transporte de alimentos, nutrientes minerais e água através de tecidos condutores (AGRIOS, 2005; MICHEREFF, 2014).

Os tipos de células e tecidos que são afetados determina o tipo de função fisiológica que será interrompida primeiro (Figura 1). Infecção de raízes pode torná-las incapazes de absorver água e nutrientes do solo; infecção do xilema interfere na translocação de água e minerais para a coroa da planta; infecção da folhagem, como acontece em manchas foliares, ferrugem, mofo, mosaicos, interferem na fotossíntese; infecção de células do floema das folhas e na casca de caules e brotos, como acontece e em doenças causadas por vírus e protozoários, interfere com a translocação descendente de produtos fotossintéticos; e infecção de flores e frutas interfere na reprodução (AGRIOS, 2005).

Os agentes utilizam diversas formas para infectar o hospedeiro, como sítios lesionados e aberturas naturais das plantas, tais como os estômatos, e enzimas podem ser secretadas pelos patógenos para invadir os tecidos das plantas por meio da degradação de macromoléculas da parede celular (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003). Geralmente interagem com o hospedeiro, invadem seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizarem a planta, retiram desta todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. A disseminação desses patógenos é realizada passivamente por agentes como ar, insetos, água, outros animais, sementes contaminadas e até mesmo pelos seres humanos (BATISTA et al., 2011; SILVA, 2017).

Figura 1. Representação esquemática das funções básicas em uma planta (esquerda) e dos tipos de interferência com essas funções (direita) causadas por alguns tipos comuns de doenças de plantas.



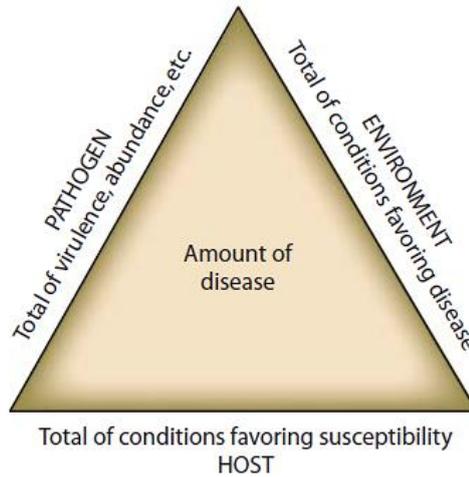
Fonte: Agrios (2005)

Alguns organismos são bastante versáteis, com grande capacidade de adaptação a ambientes diversos. Para algumas doenças, nenhuma medida de controle efetiva ainda é conhecida, ou pouco efetiva, sendo possível a obtenção de colheitas pela combinação de práticas culturais e uso de variedades parcialmente resistentes, com isso podem elevar os custos de controle (LUCAS, 1998; MALAFAIA, 2016).

Com a expansão do cultivo de plantas selecionadas, cresceu também a ocorrência de doenças. As exigências do mercado determinaram a necessidade de maior produção por unidade de área, levando os trabalhos de melhoramento a visarem apenas os aspectos agrônômicos associados à produtividade. Estes motivos, além de outros, levaram algumas culturas a verdadeiros colapsos, trazendo grandes problemas econômicos e sociais.

Segundo Agrios, (2005) a interação dos fatores patógeno, hospedeiro e ambiente é essencial para a ocorrência de doenças em plantas. A severidade das doenças infecciosas pode ser maior ou menor, dependendo de outros fatores que compõem o triângulo (Figura 2).

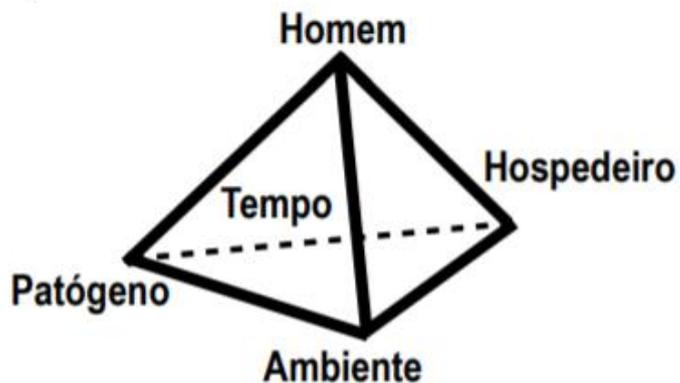
Figura 2: triângulo da doença



Fonte: Agrios, (2005)

De acordo com Carollo e Santos Filho, (2016), na agricultura o homem é um fator tão importante no manejo das doenças que os autores propõem a figura de um tetraedro ao invés de um triângulo, para melhor representar as interações entre fatores predisponentes à ocorrência de uma doença (Figura 3).

Figura 3. Tetraedro de doenças em plantas ou pirâmide de doenças

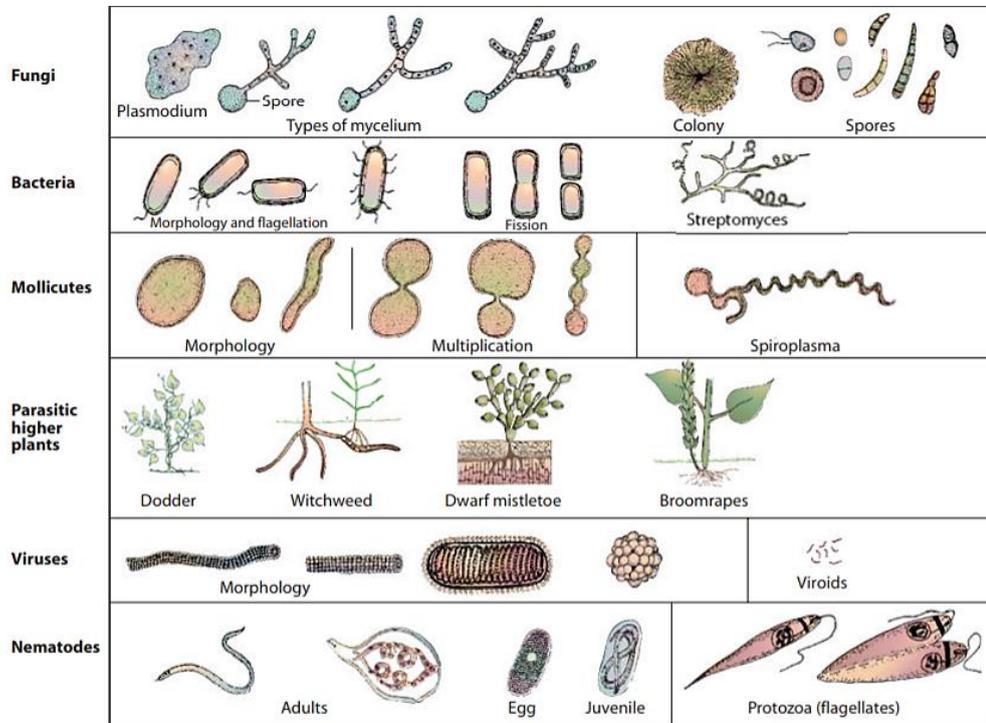


Fonte: Carollo e Santos Filho, (2016)

## 2.2 FITOPATOGÊNICOS

As plantas são continuamente expostas a uma diversa gama de patógenos como, bactérias, fungos, nematoides, vírus entre outros (Figura 4). As pragas são responsáveis, em média, por cerca de 42,1% das perdas na produção agrícola, estima-se que os fitopatógenos sejam responsáveis por 13,3% de danos, as plantas daninhas por 13,2%; e os insetos e ácaros por 15,6% (KREYCI, 2017). As perdas do agronegócio brasileiro podem chegar a R\$ 55 bilhões ao ano e avalia-se que, no mundo, as perdas da agricultura devido aos ataques de pragas cheguem a quase 5% do PIB mundial (AGROLINK, 2017).

Figura 4: Morfologia e formas de multiplicação de alguns dos grupos de patógenos vegetais.



Fonte: Agrios (2005)

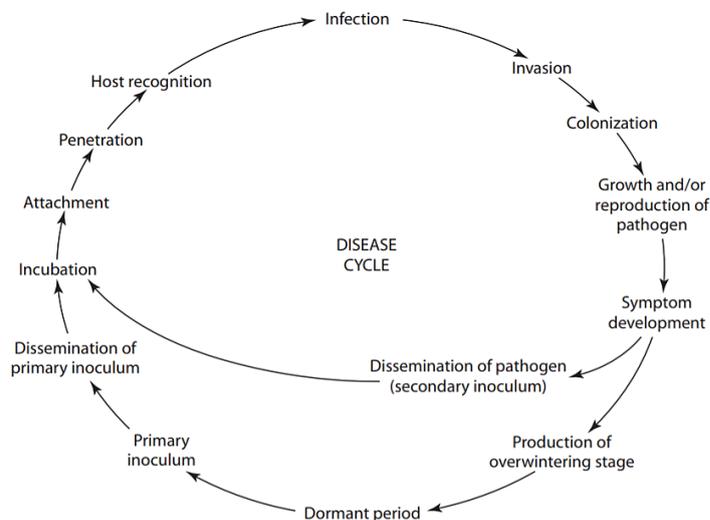
Organismos fitopatogênicos podem ocasionar perdas no agronegócio nas fases de pré e pós-colheita, prejudicar a aparência das plantas, alterar suas características físicas e químicas, assim como, diminuir o conteúdo nutricional. Eles podem ser encontrados associados a diversas partes das plantas, tais como raiz, caule, folhas, botões florais, flores, frutos e sementes (JUNQUEIRA et al., 2006; BESSA, 2017; AGRIOS, 2005).

Os danos causados pelos patógenos às plantas podem gerar efeitos diversos e significativos. A tipologia de danos ajuda a identificar os tipos e variedades de plantas que

podem desenvolver doenças em determinada área geográfica, assim como minimizar o impacto agrônomo imediato e não comprometer a capacidade futura de produção. Inclui danos potenciais e danos reais. O dano potencial pode ocorrer na ausência de medidas de controle, o dano real é o que já ocorreu ou que ainda está ocorrendo, pode ser direto e indireto. O dano real direto afeta a quantidade ou qualidade do produto ou ainda a capacidade futura de produção. Pode ser direto primário causado na pré-colheita e pós-colheita, ocorrendo desde a estocagem das sementes, passando pela germinação, crescimento da planta, colheita, manuseio e estocagem do produto colhido. Pode ser direto secundário cuja causa é o patógeno veiculado pelo solo ou disseminado por órgãos de propagação vegetativa de seu hospedeiro. Dano real indireto compreende os efeitos econômicos e sociais das doenças de plantas que estão além do impacto agrônomo imediato, podendo ocasionar danos no âmbito do produtor, da comunidade rural, do consumidor, do Estado e do ambiente. (CAROLLO e SANTOS FILHO, 2016).

Em todas as doenças infecciosas, uma série de eventos distintos ocorre em sucessão e leva ao seu desenvolvimento, ou seja, o ciclo da doença. Às vezes, corresponde perto de ciclo de vida do patógeno, mas refere-se principalmente a aparência, desenvolvimento e perpetuação da doença como uma função do patógeno e não para o patógeno em si. O ciclo da doença envolve mudanças na planta e seus sintomas. O primeiro evento em um ciclo de doença é a inoculação, seguido por penetração, estabelecimento de infecção, colonização (invasão), crescimento e reprodução do patógeno, disseminação do patógeno e sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro (Figura 5)

Figura 5: Etapas no desenvolvimento de um ciclo de doença.



Fonte: Agrios (2005)

### 2.2.1 Bactérias Fitopatogênicas

As bactérias fitopatogênicas são de grande importância pela alta incidência e severidade em culturas de valor econômico, facilidade com que se disseminam assim como as dificuldades encontradas para o controle das doenças por elas veiculadas. As bactérias penetram nas plantas através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas, hidatódios, aberturas florais etc., e também através de ferimentos. Uma vez no interior das plantas, elas podem se multiplicar nos espaços intercelulares ou no tecido vascular (SILVA, 2017; MALAFAIA, 2016).

Em condições favoráveis, doenças bacterianas podem ser responsáveis por grandes prejuízos, chegando em alguns casos a serem limitantes à exploração econômica das plantas ornamentais, frutas, hortaliças, entre outros cultivos. Além disso, os sintomas ocasionados por bactérias fitopatogênicas também podem ser causa de impedimento de exportações, além de servirem de porta de entrada a outros organismos patogênicos.

Dentre as inúmeras variedades de bactérias fitopatogênicas, algumas se destacam: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* merece destaque por causar sérios danos a uma grande variedade de hospedeiros. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* por causar a mancha aquosa, uma importante doença bacteriana para as culturas da melancia e do meloeiro. *Xylella fastidiosa*, que tem sido associada a doenças de colheitas economicamente importantes, incluindo citros, uva, ameixa, amêndoa e pêssego. *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, responsável pela mancha-angular no algodoeiro (MARIANO; SILVEIRA, 2004; SUASSUNA, 2008).

*Acidovorax citrulli* apresenta-se como bastonetes gram-negativos, aeróbicos e móveis por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento em meio de cultura de rotina como Agar nutritivo-extrato de levedura-dextrose (NYDA), onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes (MELO, 2004). É classificada filogeneticamente como pertencente ao reino Procarioto, Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Comamonadaceae, Gênero: *Acidovorax*, Espécie: *A. citrulli* (EPPO, 2016).

Agente causal da mancha aquosa ou mancha de frutos bacterianos (BFB) é uma das doenças mais destrutivas em melão (*Cucumis melo* L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) em regiões produtoras em todo o mundo, especialmente na estação chuvosa. Por sua alta severidade é um dos principais problemas enfrentados pelas culturas de melão no nordeste do Brasil, principalmente cultivado e exportado no Ceará e no Rio Grande do Norte.

Nestes estados, as perdas de produção de BFB são estimadas em 40-50%, mas podem chegar a 100% (EPPO, 2013; ALVES et al., 2018)

Os sintomas da mancha aquosa podem se manifestar em qualquer fase de desenvolvimento, nas folhas, pequenas lesões marrons escuras, angulosas e encharcadas podem aparecer, mas são geralmente imperceptíveis no desenvolvimento da planta. Plântulas oriundas de sementes infectadas, apresentam grandes manchas encharcadas de coloração verde-escura e marrons no hipocótilo, cotilédones e folhas adultas e, às vezes, necrose no hipocótilo, podendo resultar na morte das mudas após alguns dias. Os principais sintomas são encontrados nos frutos como pequenas manchas oleosas, com ou sem halo, que rapidamente progridem e coalescem, tornando-se manchas aquosas, claras ou escuras, com ou sem rachadura no centro, essas rachaduras podem servir como porta de entrada para outros microrganismos que aceleram o apodrecimento do fruto. Internamente, a bactéria causa podridão seca na polpa do fruto contaminando as sementes externa e internamente através da região do hilo, o que dificulta a erradicação. Sementes representam a fonte mais importante de inóculo primário para surtos de BFB, contaminadas produzem plântulas doentes. A bactéria se espalha entre as plântulas e infecta uma proporção significativa das plântulas. À medida que as plantas crescem no campo, o patógeno se espalha (SANTOS; VIANA, 2000; ALVES et al., 2019).

As formas mais comuns de disseminação a longas distâncias desse patógeno se dão por utilização de sementes contaminadas e pelo transplântio de mudas contaminadas. A disseminação da doença dentro da área de plantio ocorre através de respingos de água de chuva e/ou irrigação, solos previamente infestados, transmissão através de insetos, utensílios agrícolas, operários de campo. *A. citrulli* sobrevive durante a entressafra em restos de cultura, em hospedeiros silvestres e cultivados (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

*Pectobacterium carotovorum* susp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al é o agente etiológico da podridão-mole, ocorre em planta no campo e em pós-colheita, tanto no armazenamento como no transporte. Pertence ao Domínio Bactéria, Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales, Família Enterobacteriaceae, Gênero *Pectobacterium* (CARVALHO FILHO; MELO, 2008). Bactérias pertencentes ao gênero *Pectobacterium* são gram-negativas, anaeróbicos facultativos, baciliforme, móveis. Em meio de cultura têm crescimento ótimo entre 28-30°C, formam colônias pigmentadas de coloração creme, opacas, circulares ou amebóides, com bordos irregulares e de aproximadamente 1,5 a 3,0 mm de diâmetro

Os sintomas são a podridão mole, começa com uma pequena lesão encharcada com rápido alargamento no diâmetro e profundidade. A área afetada torna-se mole e murcha, os

tecidos ficam na coloração creme, desintegrando-se em uma massa podre uma junção das células desorganizadas da planta e da bactéria. Pode haver rachaduras e exsudatos da massa podre para a superfície. Os frutos podem ser convertidos em uma massa aquosa, em um prazo de 3 a 5 dias, geralmente liberam um odor desagradável (Figura 6).

Figura 6. Podridão mole da batata por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*



Fonte: Carvalho Filho; Melo (2008)

*P. carotovorum* subsp *carotovorum* possui ampla distribuição em região temperada e tropical, e pode sobreviver em diversos ambientes como solo, rios e lagos (DE BOER et al., 1987).

Perdas significativas de até 100% durante a estocagem de tubérculos de batata são atribuídas a podridões causadas por bactérias do gênero *Pectobacterium*. Os melhores meios para controlar a doença incluem plantio de tubérculos-semente saudáveis, redução de injúrias nos tubérculos durante a colheita e condições adequadas de estocagem e cultivares resistentes (BENELLI et al., 2004).

*Ralstonia Solanacearum* (Smith) é uma bactéria gram negativa, habitante do solo, classificada filogeneticamente como pertencente ao reino Procariota, Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Ralstoniaceae, Gênero *Ralstonia*, Espécie *R. solanacearum* (Smith), anteriormente chamada de *Bacillus*

*solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum* e *Burkholderia solanacearum* (YABUUCHI et al., 1995).

*R. solanacearum* é o agente causador da murcha bacteriana em numerosos hospedeiros, as espécies mais suscetíveis pertencem à família Solanaceae, que compreende, além do tomate, a batata, o pimentão, a berinjela, o jiló e o fumo. A apresenta elevada variabilidade fenotípica, tradicionalmente traduzida em raças. É uma das maiores limitações ao cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.) em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo o mundo. Esse patógeno tem alto poder de destruição por induzir sintomas de murcha rápida e fatal em plantas hospedeiras, sendo classificado como o segundo patógeno bacteriano agronomicamente mais importante. Em condições de alta infestação do solo, o controle da doença envolve, necessariamente, o uso de cultivares resistentes. A expressão da resistência, no entanto, está fortemente correlacionada com condições ambientais, como temperaturas elevadas e altos níveis de umidade do solo (COELHO NETO et al., 2003; PEETERS et al., 2013; LOPES; ROSSATO, 2013).

Em tomateiro, manifesta-se principalmente na formação do primeiro cacho de frutos (Figura 4). Ao infectar a planta por ferimentos nas raízes, a bactéria se aloja no xilema, sob condições favoráveis, ou seja, cultivar suscetível e ambiente quente e úmido, a bactéria se multiplica, produzindo alta população de células produtoras de polissacarídeos extracelulares viscosos, que obstruem o xilema, impedindo a absorção da água pelas raízes. As células bacterianas no interior do xilema também produzem enzimas que causam escurecimento vascular, observado ao corte no caule (Figura 7). Uma reação da planta à falta de água nos órgãos aéreos é a formação de raízes adventícias na parte inferior do caule (Figura 7) (LOPES; ROSSATO, 2013).

Figura 7. Planta de tomate com murcha-bacteriana, (A) Tomateiro com murcha-bacteriana generalizada (B) Escurecimento vascular na base do caule de tomateiro afetado pela murcha-bacteriana.



A

B

Fonte Lopes; Rossato, 2013

Diferentes doenças como a murcha-bacteriana, murcha-de-fusário, murcha-de-esclerócio, murcha-de-verticílio e ataque de nematoide podem atacar o tomateiro. Em alguns casos fica difícil o diagnóstico então o recomenda-se fazer o teste do copo. Corta-se uma pequena porção (cerca de 5 cm) da parte mais inferior do caule de planta doente, colocando-a em seguida ligeiramente submersa em copo transparente com água limpa (Figura 8). A presença de um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo indica a presença da murcha-bacteriana (LOPES; ROSSATO, 2013).

Figura 8: Teste do copo, mostrando exsudação de pus bacteriano em caule de tomateiro afetado pela murcha bacteriana.



Fonte: Lopes; Rossato, (2103)

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), de acordo com a classificação taxonômica está agrupada no Domínio Bactéria, Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales, Família Xanthomonadaceae, Gênero *Xanthomonas* (EUZÉBY, 1997). Bactéria gram-negativa, com formato de bastonete, apenas um flagelo para mobilidade, aeróbia e não utiliza asparagina como fonte de carbono e nitrogênio. Cresce em meios de cultura de rotina, ágar nutritivo, as colônias da maioria das espécies de *Xanthomonas* são mucoides, convexas, de cor amarelada, com diâmetro de 1 a 2mm em até 4h. Produzem um polissacarídeo extracelular chamado de goma de xantana (SCHAAD et al., 2001; MELO, 2016)

A podridão negra é a bacteriose de maior importância econômica das brássicas em geral, é capaz de reduzir a produtividade em 60% a nível mundial. Foi descrita pela primeira vez por Garman (1894) nos Estados Unidos, e desde então tem sido identificada em brássicas em todos

os continentes. No Brasil, sua distribuição é generalizada. Em Pernambuco, no município de Camocim de São Félix, é mencionada uma incidência de 77,60% para podridão negra na cultura do repolho (AZEVEDO et al., 2002; MELO, 2016).

Os sintomas dessa doença podem ser observados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Geralmente, as folhas apresentam lesões amarelas em forma de “V”, com o vértice voltado para o centro, que progridem para a nervura principal, tornando-se necrosadas. Folhas, ramos e raízes podem apresentar-se negros devido a um polissacarídeo produzido pelo patógeno (RODRIGUES NETO & MALAVOLTA JUNIOR, 1995).

O processo da invasão da bactéria é através de aberturas naturais da folha, principalmente pelos hidatódios, por ferimento, multiplica-se intensamente nos espaços intracelulares, atingindo o sistema vascular e, conseqüentemente, a todos os órgãos da planta. Surge o aparecimento de manchas foliares cloróticas a necróticas em forma de V (Figura 9), da margem foliar em direção à nervura central. Dependendo da umidade, a bactéria presente nas gotículas de água cobre a superfície das folhas e outras partes da planta, pode ser disseminada pelo vento, chuva, e pelos implementos agrícolas usados no manejo da cultura, injúrias causadas pelos insetos e ou através do sistema radicular. O Patógeno pode sobreviver nos restos culturais incorporados no solo até dois anos (BILA et al, 2012).

Figura 9. Necroses foliares em forma de V



Fonte: Bila et al, 2012 (Fotografia S.M.S. Massomo, Tanzania)

A *Xcc* pode ser transmitida por sementes, as quais constituem a fonte primária da infecção, principalmente em locais ausentes da doença. Galli et al. (2001) mencionam que a inoculação do patógeno em sementes de couve-flor com 48h é suficiente para haver contaminação de 100%, tornando-as incapazes de germinar. Não existe um método de controle efetivo da podridão negra, desse modo a prevenção é o melhor controle. Por se tratar de doença sistêmica, uma vez instalada fica difícil o controle. A semente sadia é um fator primordial no controle da doença, como também cultivares resistentes (MELO, 2016).

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv) apresenta células em formato de bastonete, monocapsuladas, monoflageladas e com 1,2 a 2,5 µm de comprimento. As colônias são arredondadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos, oxidativa, de coloração creme-esbranquiçada e gram-negativa, ausência de pigmentos fluorescente em meio King's B e de atividade de urease e oxidase, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio. Apesar desta bactéria pertencer ao gênero *Xanthomonas*, não produz xanthomonadina, por isso, suas colônias são apigmentadas.

O cancro bacteriano da videira é causado por *X. campestris* pv. *viticola*, identificada através de testes bioquímicos, culturais, fisiológicos e de patogenicidade (MALAVOLTA, 1999; NASCIMENTO, 2005). No início de 1998, foi detectado, pela primeira vez no Brasil o cancro bacteriano da videira em parreirais do Submédio São Francisco, principal área produtora de uvas finas de mesa do Brasil. onde a doença vem causando prejuízos em cultivares suscetíveis (MALAVOLTA et al., 1999)

Em plantas infectadas, nas folhas surgem como pontos necróticos de 1 a 2mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, algumas vezes coalescendo e causando a morte de extensas áreas do limbo foliar. Nas nervuras e pecíolos das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos formam-se manchas escuras e alongadas, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra conhecidas como cancrios. As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar lesões necróticas (NAYUDU, 1972)

A bactéria pode ser introduzida em parreirais através de mudas infectadas e ser disseminada, dentro dos parreirais, em restos de cultura infectados, ou através de manuseio como, por exemplo, tesouras de poda, canivetes e luvas não desinfestados, utilizados na colheita de frutos de plantas doente. A bactéria pode ser transportada por respingos de água de chuva ou irrigação, que a levem a longas distâncias. O pus bacteriano, liberado dos cancrios,

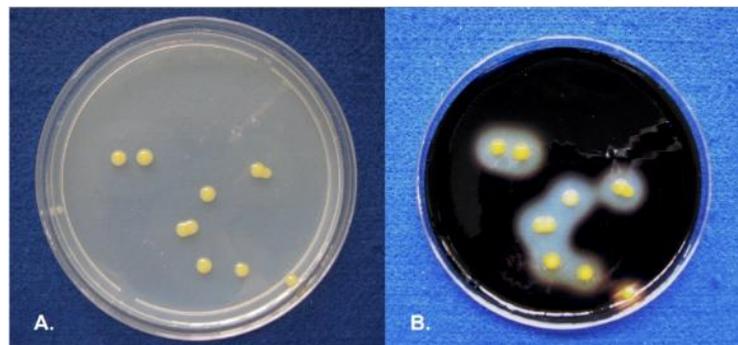
pode constituir a principal fonte de inoculo a média e curta distância veiculado em gotículas de água (NASCIMENTO, 2005; TRINDADE, 2007).

Danos causados por *X. campestris* pv. *viticola* na região do Vale do São Francisco são significativos, sendo um dos maiores problemas fitossanitários da videira na região. O controle pode ser baseado em medidas preventivas tais como o estabelecimento de quebra-ventos, inspeções periódicas dos parreirais para detectar a presença de sintomas e a instalação de tapetes de cal virgem ou pedilúvio com amônia quaternária (0,1%) na entrada da área da produção. Evitar o trânsito de máquinas e equipamentos entre áreas produtoras, utilizar mudas e material propagativo com Certificação Fitossanitário de Origem (CFO) e ainda a utilização de controle com agroquímicos (TRINDADE, 2007).

*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) pertence ao grupo das Gran-negativas, aeróbica, apresentam morfologia de bastonetes retos, isolados, medindo 0,4-0,7 x 0,7-1,8  $\mu\text{m}$ , são móveis por meio de um flagelo polar. A maioria das linhagens do gênero *Xanthomonas* apresenta colônias lisas, mucoides e de coloração amarelada (Figura 10) devido à presença de xantomonadina (BALANI, 2009).

Dentre as bacterioses do algodoeiro, a macha-angular provocada pela bactéria (*Xcm*) ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtora de algodão do mundo. Os sintomas são caracterizados por lesões angulosas, delimitadas pelas nervuras, de coloração parda e consequentemente necrose do tecido. A disseminação do patógeno pode ocorrer interna e externamente nas sementes, sendo essa a principal fonte de disseminação em longas distâncias. A curtas distâncias a disseminação é favorecida por ventos, insetos, implementos agrícolas e chuvas frequentes, a bactéria é transmitida de uma planta pra outra por meio de respingo de água.

Figura 10: *Xanthomona citri* subsp. *malvacearum* em placa de Petri. A. colônias crescidas em meio de cultura com amido. B. Formação de halo translúcido ao redor das colônias, após adição de lugol.



Fonte: Balani, (2009)

### 2.2.2 Fungos Fitopatogênicos

Doenças causadas por fungos são consideradas como uma das principais causas de perdas na fase de plantio, armazenamento e comercialização de frutas tropicais. Objetivando minimizar o uso dos agrotóxicos por produtos alternativos, muitos pesquisadores vêm realizando estudos que revelem alternativas de tratamentos, seja para melhorar a qualidade desses alimentos, seja para o controle de fitopatógenos (PEIXINHO et al., 2017).

Fungicidas originados de plantas são utilizados há séculos. As pesquisas envolvendo a procura de fungicidas obtidos de plantas, porém, só vêm aumentando nos últimos vinte anos. Têm se constatado na literatura pesquisas *in vitro* demonstrando que diversos patógenos pode ser controlado com eficiência, por meio de extratos vegetais (VENTUROSO, 2009).

Os fungos de solo são responsáveis por perdas importantes em todos os tipos de cultivos agrícolas, não só nas lavouras, mas também nos produtos pós-colheita. Causam sérias doenças e, dependendo do patógeno, ocasionam lesões nos órgãos de reserva como os frutos, sementes, no caule, nas raízes, no sistema vascular, dependendo da intensidade da doença, levam as plantas à morte. Outro grande problema é a queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores. Exemplos de fungos de solo são: *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium lecani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Plasmodiophora brassicae*, *Rhizopus stolonifer*, entre outros.

A podridão cinzenta do caule causada por *M. phaseolina*, é de ocorrência generalizada nos solos cultiváveis do Brasil. É uma enfermidade que se manifesta principalmente em solos compactados, onde as raízes não conseguem se aprofundar e estão mais sujeitas às condições de estresse hídrico. *M. phaseolina* é capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais, tais como, feijão, milho, sorgo, amendoim, algodão e girassol, soja, entre outras (ALMEIDA, 2014).

O patógeno foi descrito por Goidanish em 1947 após revisar a taxonomia do gênero *Macrophomina*, constituído por apenas uma espécie: *M. phaseolina* (Tassi) Goid. O fungo pertence ao filo Ascomycota, família Botryosphaeriaceae, sendo caracterizado pela produção de picnídios e microescleródios nos tecidos dos hospedeiros (NDIAYE, 2007; GOMES, 2014).

O micélio do fungo é uninucleado, entretanto, células das extremidades do micélio, região de crescimento, são usualmente multinucleadas de coloração acinzentada a preto, com as hifas formando ramificações em ângulo reto, produz picnídios negros e globulosos solitários ou agregados, que geralmente ocorrem nos tecidos vivos (KNOX-DAVIES, 1967). Segundo

Pearson et al. (1987) existem diferenças morfológicas entre isolados e quando cultivados em BDA alguns deles não produziram picnídios, e também podem variar quanto à virulência.

Wrather e Koenning, (2006) mencionam que a podridão de carvão foi classificada em segundo lugar na lista de doenças que afetaram a produção de soja em 2003, nos EUA. No Brasil, a ocorrência de *M. phaseolina* foi relatada pela primeira vez infectando raízes de feijão (BITANCOURT, 1935). Este fungo foi constatado nas Américas do Norte e do Sul, Ásia, África e Europa. Em regiões semiáridas de países com clima tropical a subtropical ele é economicamente mais importante (NDIAYE, 2007).

A infecção de *M. phaseolina* em feijão caupi ocorre em diversas fases de crescimento da planta. Na plântula os sintomas são observados nos cotilédones, na planta adulta, presença de lesões necróticas na região do colo, amarelecimento, murcha, desfolhamento prematuro e morte da planta (DHINGRA e SINCLAIR, 1978).

Almeida et al (2014) mencionam que em tecidos infectados, o fungo *M. phaseolina*, produz microescleródios em grande quantidade, os quais constituem em uma das formas de sobrevivência do fungo. Microescleródios são produzidos a partir do micélio, consistindo de estrutura multicelular, dura e resistente a condições adversas, e são facilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo. No ciclo da podridão de carvão, após a morte da planta, a colonização dos tecidos do hospedeiro e a formação de microescleródios continuam, com a decomposição desses tecidos, os microescleródios são liberados no solo. Quando introduzidos em uma nova área, os microescleródios passam a ser a principal fonte de inóculo primário do fungo. Dependendo das condições ambientais e do contato com a região do colo ou da raiz da planta, germinam e infectam as raízes. Meyer et al. (1974) afirmam que os microescleródios são capazes de sobreviver no solo por dois a quinze anos.

No plantio de soja, as plantas doentes apresentam lesões necróticas nas raízes, caule, ramos e pedúnculos por onde chegam até às vagens e invadem os grãos, que se destinados à semente, tornam-se a principal fonte de disseminação na maioria das culturas afetadas. Plantas severamente infectadas morrem prematuramente em virtude da produção de toxinas do fungo e pelo bloqueio dos vasos do xilema (GOMES, 2014).

Uma característica importante de *M. phaseolina* é a dificuldade que alguns isolados apresentam em esporular abundantemente em meios artificiais. Tal característica tem dificultado os estudos relacionados à patogenicidade e a fontes de resistência pois a presença

de conídios viáveis é fundamental. Muitas vezes se faz necessário a indução artificial de esporulação para solucionar o problema

Lehman et al. (1976) efetuaram um levantamento de doenças de soja na safra de 1973/1974 e constataram que em 104 lavouras localizadas nos Estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, avaliadas quanto à incidência e à severidade das doenças, 5% das plantas apresentavam infecção radicular causada por *M. phaseolina*. Ferreira et al. (1979), afirmam que em anos secos e quentes, na região Norte do Estado do Paraná, as perdas em soja de vários cultivares, atingidos por *M. phaseolina* chegaram a atingir 50%. Na safra 1996/97, os prejuízos no Brasil foram estimados em 900 mil toneladas de grãos (WRATHER et al., 1997).

*Fusarium solani* (Mart.) Sacc Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, Família Nectriceae que está representada por 32 espécies e 18 variedades e tem como sinonímia *Fusarium javanicum* (INDEX FUNGORUM, 2011). A principal característica do gênero *Fusarium* é a formação de conídios alongados, fusiformes, com vários septos. É o terceiro gênero de fungos com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas, humanos e animais. Produzem uma gama de toxinas que estão associadas a doenças em plantas, mas também podem causar danos à saúde humana e animal (MELO, 2014).

O gênero *Fusarium* apresenta uma expressiva importância na agricultura por ser um patógeno de interesse econômico para várias culturas tais como: milho, tomate, soja, trigo, feijão-caupi, causando a podridão das raízes, murcha e fusariose. Pode ser encontrado habitando o solo nas mais diversas regiões geográficas do mundo, principalmente em climas tropicais e subtropicais. Os clamidósporos, que são esporos de resistência, fazem com que esse patógeno sobreviva por longos períodos no solo e assim pode colonizar, folhas, flores, ramos, inflorescências e frutos através dos conídios que são disseminados pelo vento ou pela água. A disseminação pode ocorrer também por implementos agrícolas que contenham solo contaminado por propágulos do fitopatógeno (DAVIS, et al., 2006; TINOCO, 2010).

Resultados obtidos pela Embrapa Milho e Sorgo na safra de 2006 e 2007, mostraram que dentre os principais patógenos associados à podridão do colmo em milho, 20,68% são do gênero *Fusarium* (COSTA et al., 2008). Notaro et al., (2013) efetuaram o primeiro levantamento de fungos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco. Foram realizadas coletas de material vegetal com sintomas e/ou sinais da doença em quatro municípios que estão entre os principais produtores do estado: Jupí, Jucati, São João e Caetés. Houve

prevalência de fungos *Fusarium solani* associados à podridão radicular em mandiocas provenientes das áreas dos municípios de Jupi, Jucati e São João, e de *Scytalidium lignicola* provenientes de áreas do município de Caetés.

O termo *Gibberella fujikuroi species complex* (GFSC) compreende um grupo monofilético que corresponde, em grande parte, à antiga seção *Liseola*, mas também inclui espécies originalmente classificadas em outras seções de *Furarium*. Atualmente, pela nova proposta de nomenclatura, esse complexo passou a ser denominado *Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC). O FFSC é composto por mais de 60 espécies biológicas e filogenéticas formalmente descritas (GEISER et al., 2013; MELO, 2014).

Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* engloba importantes patógenos de plantas como, por exemplo, *Fusarium udum* é o agente causal em murcha de *Cajanus cajan* e espécies de *Crotalaria*. Outras espécies como *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. andiyazi*, *F. verticilloides*, *F. proliferatum* são associados à podridão de colmo e espiga em sorgo, milho e milheto (LESLIE et al., 2005; MELO, 2014).

Espécies de *Fusarium* também estão associadas a doenças pós-colheita, *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. musae*, *F. semitectum* e *F. camptoceras* foram isolados de frutos de banana com podridão de coroa (MORETTI et al., 2004). Leslie; Summrell, (2006) relatam *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutnans* e *F. temperatum*, em gramíneas cultivadas causando podridão do colmo e espiga.

Leyva-Madrigal, (2014) avaliaram a diversidade de fungos do FFSC de uma coleção de 108 isolados fúngicos obtidos de plantas de milho entre 2007-2011. Foram identificados *Fusarium verticillioides*, *F. nygamai*, *F. andiyazi* e *F. thapsinum* correspondendo a 79, 23, 4 e 2 isolados respectivamente. *F. verticillioides* e *F. nygamai* foram os mais agressivos. Estas espécies foram capazes de colonizar todos os tecidos da raiz, desde a epiderme até os vasos vasculares, enquanto a infecção por *F. andiyazi* e *F. thapsinum* estava restrita à epiderme e às células corticais adjacentes. Este é o primeiro relato de *F. nygamai*, *F. andiyazi* e *F. thapsinum* infectando milho no México

Principal agente etiológico da podridão mole, *Rhizopus stolonifer* pertence ao Filo Zygomycota, Ordem Mucorales, e Família Mucoraceae. Entre os agentes causais de doenças pós-colheita em pêssegos destaca-se o *Rhizopus*, que é um gênero considerado polífago e causa podridões em numerosos tipos de vegetais e frutos (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011).

Os sintomas causados por *Rhizopus stolonifer* são caracterizados pela presença de áreas circulares marrons e aquosas no fruto infectado, que liberam substâncias de odor ácido ou fermentado. Observa-se uma massa de micélio densa e macia de coloração acinzentada, crescendo na superfície do fruto. O sintoma aquoso no fruto aparece geralmente após dois ou três dias, devido à rápida destruição dos tecidos causada pela grande quantidade de enzimas pécnicas (BAGGIO, 2012). Apesar das afirmações na literatura de que *R. stolonifer* penetra seus hospedeiros exclusivamente na presença de ferimentos, estudos preliminares recentes sugerem que o fungo seja capaz de causar doenças em frutos não injuriados, pela proximidade de frutos sadios com frutos doentes (BAGGIO, 2012).

Uma das importantes doenças da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é o carvão, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw. Anteriormente chamado de *Ustilago scitaminea*, pertence ao Filo: Basidiomycota, Subfilo Ustilaginomycotina, Classe Ustilaginomycetes, Subclasse: Ustilaginomycetidae, Ordem Ustilaginales, Família Ustilaginaceae (HAUKSWORTH et al., 1995; SILVEIRA, 2016).

O *S. scitamineum* é parasita de tecidos meristemáticos. Sua penetração na planta é realizada por hifas dicarióticas através de tecidos não diferenciados da parte basal das gemas ou pela base das primeiras folhas emergentes. A disseminação do carvão pode ocorrer pelo transporte aéreo de teliósporos, transporte realizados por insetos, e através de mudas ou solo contaminado. O uso de cultivares resistentes é a medida mais utilizada de controle (FRAGOSO, 2015).

O patógeno apresenta especificidade em relação ao hospedeiro, necessita de hospedeiro vivo para seu ciclo de vida e convive por longo período no hospedeiro, cerca de dois a sete meses antes de apresentar sintoma nas plantas infectadas. Infecta gemas de cana-de-açúcar ou tecidos meristemáticos sob condições de umidade e temperatura favoráveis ao patógeno. Os danos econômicos em função do carvão são significativos, podendo causar perda de até 100% da plantação (BUENO, 2010; TOKESHI; RAGO, 2005).

A cana infectada por *S. scitamineum* tem o meristema apical modificado, sendo denominado “chicote” (Figura 11). Fica recoberto por uma película prateada que contém uma massa escura de teliósporos pretos e pulverulentos que são facilmente destacados pelos ventos (BOLDINI, 2016).

Figura 11. Chicote apical em touceira de cana-de-açúcar infectada pelo fungo por *S. scitamineum*



Fonte: Santos (2013)

James (1973) verificou a redução em sacarose das plantas afetadas pela doença, fato este explicado pelo decréscimo do diâmetro das plantas doentes. Um conjunto de fatores colabora para a redução da produtividade como: redução no diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução dos perfilhos industrializáveis e perdas do teor de sacarose pelo aumento de fibra e consequente menos extração de açúcar (BUENO, 2010).

Tokeshi (1987), após avaliar campos plantados com cana-de-açúcar, variedade NA56-79, no estado de São Paulo, registrou a incidência de 80% da doença do carvão. No Brasil, pelo menos 14 doenças fúngicas de cana-de-açúcar são registradas: ferrugem (*Puccinia melanocephala*), registrada em todas as regiões de cultivo do país; carvão (*S. scitamineum*) registrada em todas as regiões de cultivo; mancha amarela (*Mycovellosiella koepkei*), predominante em áreas com maior índice de precipitações (como na Amazônia); mancha ocular (*Bipolaris sacchari*), de ocorrência em pequena escala e com maior importância nos canaviais do sul, por ser favorecida por invernos chuvosos e úmidos; mancha parda (*Cercospora longipes*), que causa poucos problemas e cujo patógeno ainda não é bem estudado; podridão de fusarium (*Fusarium moniliforme*), associada com injúrias físicas, químicas ou biológicas; Pokkah-Boeng (*Fusarium subglutinans*) e; podridão-abacaxi (*C. paradoxa*) (DOS SANTOS, 2008; SANTOS, 2013).

Barbasso et al., (2010) reportaram o primeiro registro da Ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) no estado de São Paulo. Os autores mencionaram que a ferrugem alaranjada deverá se expandir para outras importantes áreas brasileiras produtoras de cana-de-açúcar, incluindo os estados nordestinos.

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio, colheita e armazenamento. Vários gêneros fúngicos podem produzir micotoxinas, porém, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, são os gêneros que produzem toxinas de maior importância. Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por espécies de *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*. São compostos altamente tóxicos, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos encontrados em uma ampla variedade de produtos agrícolas importantes como por exemplo, milho, amendoim, arroz (RUSTON, 1997; AQUINO, 2003).

*Aspergillus* é um gênero composto por mais de 180 espécies anamórficas aceitas com o teleomorfismo em nove gêneros diferentes. O gênero é facilmente identificado pelas características do conidióforo, mas a identificação das espécies e diferenciação é complexa. Macroscopicamente as colônias pertencentes ao gênero *Aspergillus* são caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente apresentem coloração amarelo puro, tornando-se acinzentadas com a idade (RUSTON, 1997; AQUINO 2003).

*Aspergillus flavus* se desenvolve bem em substratos oleaginosos e, em menor frequência, em substratos ricos em amido, como o milho, aumentando o nível de produção de aflatoxinas. Umidade relativa do ar entre 80% e 90% e temperatura acima de 25° favorecem o desenvolvimento de *A. flavus*, caracterizando-o como fungo de armazenamento (RUSTON, 1997; AQUINO 2003).

As espécies de *Aspergillus* são espécies sapróbias e habitam preferencialmente o solo, mas podem ser isoladas de água, ar, plantas e animais. Várias espécies causam infecções, as mais comuns são *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*. Aspergilose é o nome dado à infecção micótica provocada por qualquer espécie pertencente ao gênero *Aspergillus* (LACAZ, 2002).

## 2.3 CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

### 2.3.1 Controle Convencional

Os Agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas no combate de pragas na agricultura, pecuária e em domicílios (herbicidas, fungicidas, inseticidas, bactericidas, nematicidas, entre outros) amplamente utilizados no mundo e especialmente no Brasil, que está entre os países campeões no consumo dos mesmos, muitas vezes de forma indiscriminada e sem as devidas medidas de proteção. O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo (BRASIL, 2014) No Brasil, entre os anos de 2001 e 2008, a comercialização de defensivos agrícolas químicos sofreu um aumento de U\$ 2 bilhões para mais de U\$ 7 bilhões (LONDRES, 2011)

O uso de agrotóxicos por unidade de área é um dos problemas da agricultura mundial. Esta prática no meio rural brasileiro tem trazido uma série de consequências como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras; o desequilíbrio biológico com a eliminação de organismos benéficos; a redução da biodiversidade e o aumento das intoxicações ocupacionais, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro (KORBES et al., 2010). Em geral, essas consequências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores. O uso intenso dos agrotóxicos e os impactos que estes podem causar tornaram-se um relevante problema ambiental e de saúde pública.

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, consideram-se agrotóxicos e afins:

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento; [...] (BRASIL, 1989).

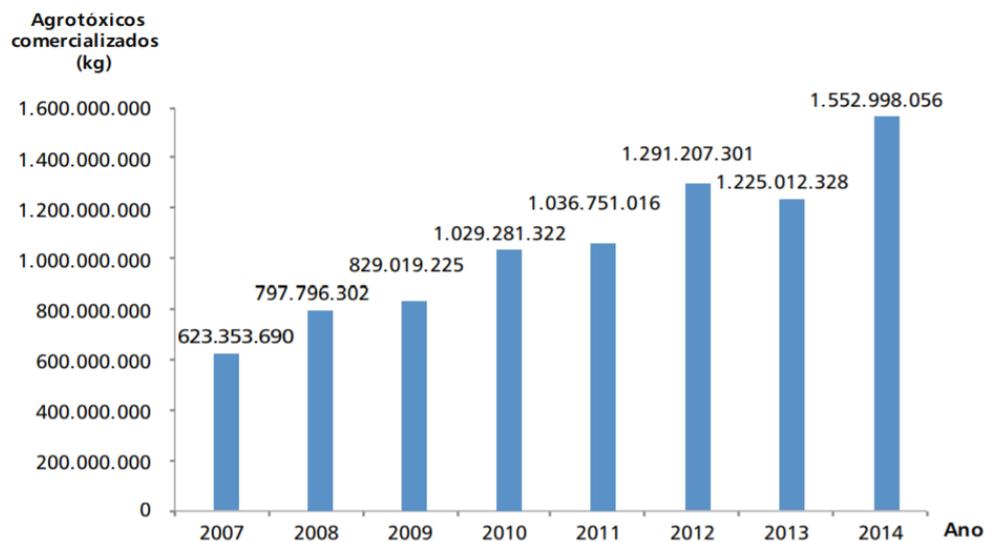
Os agrotóxicos estão presentes no cotidiano da população em geral, principalmente dos trabalhadores agrícolas, das mais diversas formas, expondo-os aos variados riscos à saúde

decorrentes deste uso. Os efeitos nocivos à saúde humana podem ser caracterizados por reações alérgicas, intoxicações, alterações hematológicas, alterações nos sistemas respiratório, cardiovascular, pele e olhos, entre outras (BRETTAS, 2016).

Em 2014 foi registrada no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (Sinan) a maior incidência de notificação de intoxicações por agrotóxicos no Brasil: 6,26 casos para cada 100 mil habitantes. Entre 2007 e 2015 foram notificados 84.206 casos (BRASIL, 2018).

Segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), em 2014 foi registrada a maior quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil. Entre 2007 e 2014 (Figura 12) esse quantitativo passou de cerca de 623.353.699 quilos para 1.552.998.056 quilos, um aumento equivalente a 149,14%. Por sua vez, a área plantada (representada pela soma da lavoura temporária e da lavoura permanente) aumentou de 62.338.730 hectares para 76.246.588 hectares (22,31%). No que se refere à comercialização de agroquímicos por hectare de área plantada, o Brasil registrou 16,87 kg/ha (BRASIL, 2018).

Figura 12: Quantitativo de agrotóxicos e afins comercializados no Brasil entre 2007 e 2014



Fonte: Agrofit/MAPA 2014, Apud BRASIL 2018.

O herbicida glifosato, foi o mais vendido em 2014, correspondendo a 488.388.696,10 quilogramas, equivalente a 31,45% do total de agrotóxicos comercializados no País (Figura 13). O glifosato é referido como um produto provavelmente carcinogênico para humanos (BRASIL, 2018).

Figura 13: Agrotóxicos químicos mais comercializados no Brasil 2014

Classificação	Agrotóxicos	Total (kg) 2014
1	Glifosato <sup>b</sup>	488.388.696,10
2	2,4-D <sup>c</sup>	52.889.356,02
3	Óleo mineral (hidrocarbonetos alifáticos)	52.239.957,28
4	Acefato (organofosforado)	48.891.645,90
5	Metomil (metilcarbamato de oxima)	48.502.231,65
6	Clorpirifós (organofosforado)	46.760.108,99
7	Atrazina (triazina)	35.397.501,74
8	Dicloreto de paraquate (bipiridilio)	32.920.024,56
9	Carbendazim (benzimidazol)	15.307.157,79
10	Mancozebe (alquilenobis (ditiocarbamato))	14.770.319,00

Fonte: Agrofit/MAPA 2014, Apud BRASIL 2018.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, citados pelos especialistas, o Brasil registrou 5.501 casos de intoxicação em 2017, uma média de 15 pessoas por dia. Mais de 150 pessoas morreram no Brasil como resultado de envenenamento neste mesmo ano (BRASIL, 2018). Nesse sentido, surge a necessidade de conciliação do desenvolvimento econômico com a promoção do desenvolvimento social e da sustentabilidade ambiental,

### 2.3.2 Controle Alternativo

Um dos principais problemas da agricultura sustentável refere-se ao controle de doenças, pragas e plantas invasoras. Antes das facilidades da aquisição de agroquímicos para o controle dos problemas fitossanitários, os agricultores utilizavam produtos obtidos a partir de materiais disponíveis nas proximidades de suas propriedades, como por exemplo, as plantas medicinais. Entretanto, esse uso foi diminuindo com a popularização do uso dos agroquímicos. Devido à conscientização dos problemas causados pelos produtos químicos à saúde do agricultor e ao ambiente, a sociedade vem exigindo a redução de seu uso. Diversos produtos, muitos deles já utilizados pelos agricultores em décadas passadas, estão sendo pesquisados com o propósito de produzir defensivos agrícolas naturais, biologicamente ativos, visando avaliar sua eficácia no controle alternativo de organismos fitopatogênicos (AMARAL et al., 2002; NEVES et al., 2005).

Os métodos alternativos para o controle de doenças de plantas têm por propósito oferecer alternativas para minimizar a dependência dos defensivos agrícolas, assim como, alcançar a redução de doenças nas plantações, aumento da produtividade e qualidade dos produtos agrícolas e contribuir para a prática de uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade (BETTIOL, 2015). Atualmente, a produção de fruticulturas no Brasil busca a utilização de práticas de manejo fitossanitário, ambientalmente seguras e ao, mesmo tempo, economicamente viáveis, que favoreçam a utilização de produtos orgânicos, que não apresentem restrições à sua utilização (SANGHA et al., 2014).

As plantas produzem larga e diversa quantidade de compostos orgânicos chamados metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural e de armazenamento de energia. Os secundários, as defendem contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos e têm uma relação da planta com o meio ambiente, essas substâncias são produzidas em resposta a estímulos ambientais de natureza física, química ou biológica, que podem alterar a composição química dos vegetais.

O reconhecimento das propriedades biológicas de muitos desses metabólitos, resulta em um elevado número de pesquisas voltadas a buscas por novas substâncias na indústria farmacêutica, cosmética e agrícola com atividade antimicrobiana, acaricida, inseticida, fungicida, nematocida e herbicida. Dentre os métodos alternativos de controle das doenças em plantas, a utilização de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais pode ser uma opção viável, do ponto de vista econômico e principalmente ambiental (RODRIGUES et al., 2006).

As vantagens relacionadas ao uso de produtos de origem natural, deve-se ao fato de serem menos tóxicos, serem degradados com facilidade pelo ambiente, serem oriundos de recursos renováveis e por possuírem um amplo modo de ação. Não persistem no meio ambiente, por não apresentarem resíduos químicos, minimizando problemas ambientais e à saúde humana, tornando o produto mais seguro e saudável ao consumidor final (FERRAZ, 2008). Entretanto, algumas limitações, como a rápida degradação (por luz e/ou calor), período curto de viabilidade, disponibilidade de matéria prima e a falta de regulamentação que estabeleça a sua utilização, a baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos produtos durante sua manipulação, também são algumas limitações encontradas nesses produtos (SILVA et al., 2005). Apesar disso, o uso de produtos botânicos surge como uma opção de manejo de pragas e patógenos que, associada a outras práticas, pode contribuir para a

redução de doses e aplicações de produtos químicos sintéticos (MACHADO et al., 2007; POTENZA, 2004).

A utilização de produtos naturais pode ser considerada uma alternativa importante para o controle de bactérias, fungos fitopatogênicos, uma vez que são biodegradáveis e não agridem ao ambiente. Algumas espécies de vegetais e algas têm demonstrado potencial no controle de pragas (GOMES, 2012).

#### 2.4 PRODUTOS NATURAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO

Metabólitos secundários nas plantas podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos (25.000 tipos, 55%), compostos fenólicos (8.000 tipos, 18%) e alcaloides (12.000 tipos, 27%) (TAIZ; ZEIGER, 2009; DEVAPPA et al., 2011; (PINO; SANCHEZ; ROJAS, 2013; SILVA, 2017).

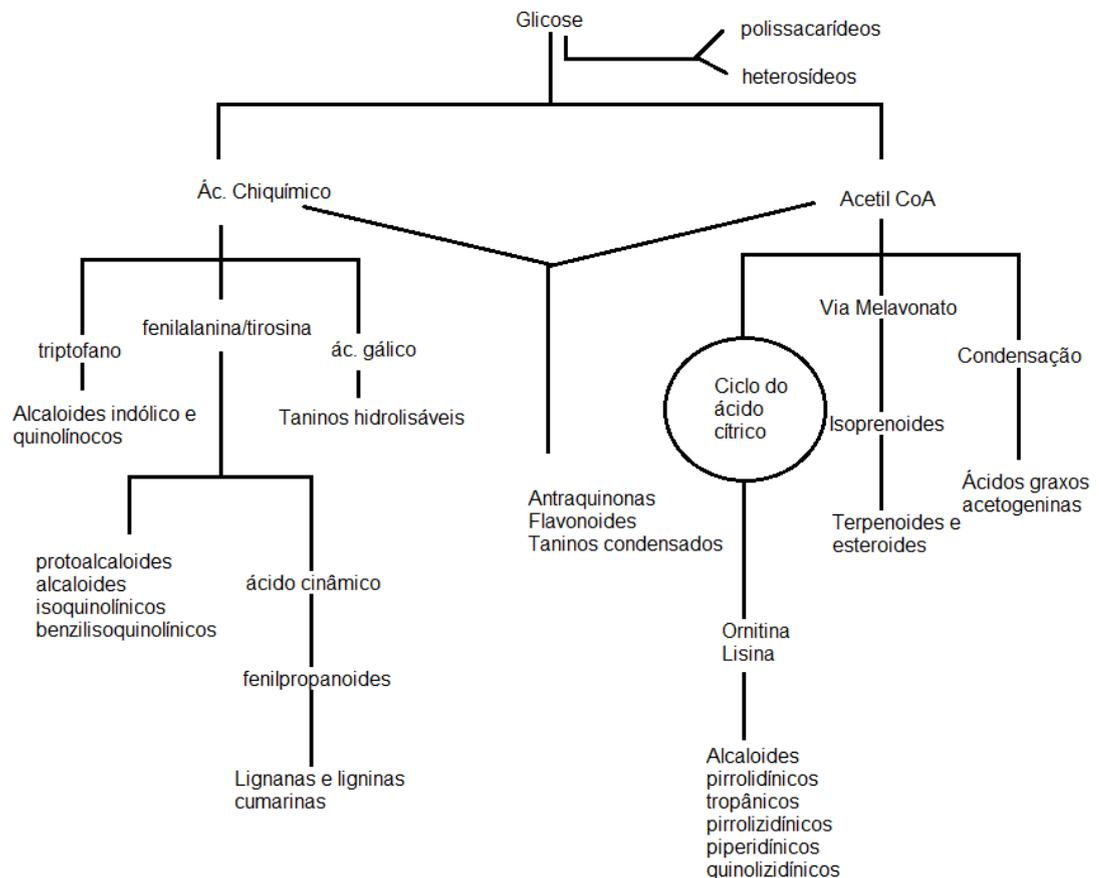
Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto), conhecidos também como terpenoides ou isoprenoides (Figura 14), compreendem, do ponto de vista estrutural, a mais diversificada classe de metabólitos secundários de plantas, com mais de 40.000 membros identificados, sendo alguns exemplos os óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitoreguladores (DEVAPPA et al., 2011; SILVA, 2017).

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio da rota do ácido chiquímico e do ácido mevalônico e desempenham um importante papel na natureza, auxiliando na maturação dos frutos, na proteção contra organismos patogênicos (bactérias e insetos), regeneração do vegetal e radiação ultravioleta. Diversas são as formas antioxidantes que os compostos fenólicos podem atuar, entre elas estão agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais de transição, como o  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^{+}$ , e desativadores do oxigênio singlete.

Os compostos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos de grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático onde ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (-OH). Os principais grupos de compostos fenólicos são: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (flavonois, flavanonas, isoflavanos, flavanois, flavonas e antocianidinas), estilbenos, ligninas e taninos (NACZK; SHAHIDI, 2004; PAZ et al., 2015; SILVA, 2017).

Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). São compostos nitrogenados, na maioria das vezes farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas. Basicamente são constituídos por um átomo de nitrogênio, oriundos dos aminoácidos e um anel heterocíclico. Os alcaloides são encontrados em diversas partes de um vegetal, como tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Constituem-se num vasto grupo de metabólitos com uma grande diversidade estrutural representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (HENRIQUES et al., 2004; ALVES, 2001; SILVA, 2017).

Figura 14. Esquema simplificado da principal rota de biossíntese de metabólitos-secundários.



Fonte: SIMOES et al. 1999 (adaptado) (Apud Malafaia, 2016)

Os metabólitos secundários podem sofrer interferência em sua produção biológica. Dentre os fatores associados a alterações qualitativas e quantitativas na produção de metabólitos secundários destacam-se as interações bióticas (planta/micro-organismos, planta/insetos, planta/planta), idade, estágio de desenvolvimento, ritmo circadiano e os fatores abióticos:

luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrientes, sazonalidade, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, composição atmosférica e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MORAIS, 2009; SILVA, 2017).

O ambiente marinho, principalmente nas regiões tropicais, apresenta uma diversidade de espécies comparável àquele presente nas florestas tropicais. Esta riqueza de espécies é capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com um potencial elevado para descoberta de novos fármacos. As algas marinhas são conhecidas por produzir uma gama de produtos bioativos com possíveis usos na indústria farmacêutica, apresentando ações como anticoagulante, antifúngica, anti-helmíntica, antibacteriana e anti-inflamatória (MOLINSKI et al., 2009; GOMES, 2012).

Segundo Mayer e Hamann (2005) e Smit (2004), a maioria dos compostos de macroalgas marinhas que apresentam atividades biológicas pertencem à classe de lectinas, terpenos e polissacarídeos sulfatados. Dentre os metabólitos secundários bioativos isolados a partir de algas marinhas destacam-se: sesquiterpenos, policetídeos, esteróis, terpenóides, diterpenos, triterpenos, acetogeninas, ácidos graxos, carotenoides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (CARDOZO et al., 2007).

Acredita-se que a produção de metabólitos secundários esteja relacionada à adaptação da alga ao ambiente marinho.

#### **2.4.1 Indução de Resistência**

O potencial para uso de indutores de resistência no controle de doenças despertou a comunidade acadêmica e comercial. Já existem alguns produtos no mercado Internacional como por exemplo o Oryzamate®, Bion®, Elexa®, Messenger® (CARDOSO-FILHO, 2003).

Nos problemas fitossanitários, a indução de resistência representa um grande potencial, embora muitos mecanismos no processo da indução ainda são um mistério. Existem pesquisadores que acreditam na possibilidade de um indutor para um certo patógeno, ter efeito de indutor de suscetibilidade a pragas e animais herbívoros (CARDOSO-FILHO, 2003).

A indução de resistência em planta contra patógenos representa um método alternativo no controle de doenças, a qual ativa os mecanismos de defesas latentes na planta. A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI, 1998).

Há duas formas principais de resistência: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI), são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes (STICHER; MAUCH MANI; MÉTRAUX, 1997). A planta após a exposição a um agente indutor tem seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes. Na RSA o elicitor é um agente patogênico ou parasita, já a RSI ocorre quando esse agente é benéfico, simbiote ou abiótico. Estes mecanismos e reações de defesa podem determinar o sucesso da resistência da planta contra o ataque do fitopatógeno evitando, assim, o estabelecimento da doença (STINIZI et al., 1993).

A RSA pode ser ativada pela exposição da planta a organismos patogênicos ou por indutores químicos como o ácido Salicílico, 2,6-dicloroisonicotínico e o Bion®. Um intervalo de tempo é necessário para o estabelecimento da RSA, que é o tempo requerido para o acúmulo de proteínas relacionada à patogênese, a depender da planta e do agente indutor. A RSA se explica pela manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca a necrose que é uma característica na RSA e a translocação desse sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerá a planta contra agressões subsequentes (STICHER, et al., 1997; ZARNADO, 2009). Dentre os mecanismos induzidos de defesa pela RSA estão as modificações de parede celular, produção de fitoalexinas e aumento de expressão de um grupo de genes, incluindo aqueles que traduzem para proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR). Sua indução é salicilato dependente (SILVA et al., 2008)

A RSI é potencializada por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV). O agente indutor é usualmente um não-patógeno, não provoca sintomas, como necrose no local da infecção, mas induz a planta a se proteger sistemicamente. Também não está associada ao acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, não é salicilato dependente, em vez disso, depende da rota de sinalização regulada pelo jasmonato e etileno (PIETERSE; VAN LOON, 1999).

As plantas detectam o ataque de microrganismos ou de elementos estranhos através de componentes de superfície do invasor ou através de moléculas sinalizadoras, também chamadas de eliciadores. Portanto, eliciadores são moléculas capazes de acionar as respostas de defesa de plantas desde mudanças celulares como a reação de hipersensibilidade até mudanças moleculares, como a ativação de genes de defesa (HAHN, 1996).

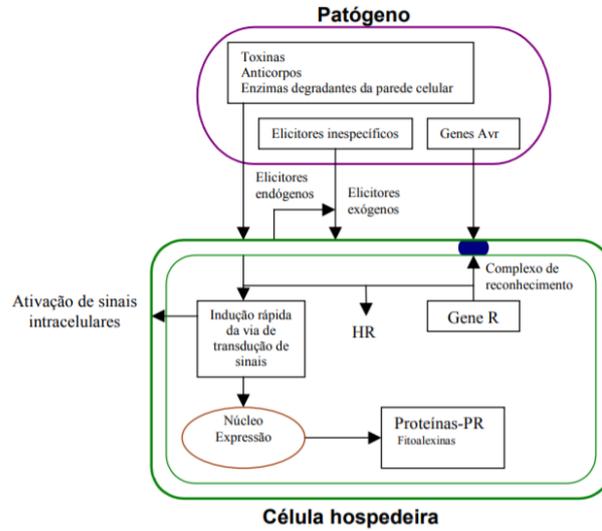
Os eliciadores podem ser agrupados em gerais ou inespecíficos e específicos. Os gerais ativam respostas de defesa inespecíficas em diversas espécies de plantas. Os eliciadores

específicos, codificados por genes de avirulência do patógenos (*Avr*) raça-específica, induzem resposta de defesa em cultivares específicos (ZANARDO, 2009).

As plantas apresentam um conjunto de mecanismos de defesa contra patógenos, que podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados e outros que são induzidos como resposta de defesa ao processo de infecção. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno. Exemplos de mecanismos de defesa estrutural pré-existent: cutícula, tricomas, estômatos, fibras, vasos condutores, parede celular primária e secundária. Os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno. Exemplos dos bioquímicos são os fenóis, alcaloides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores proteicos, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases. Exemplo de pós-formados estruturais (ativos ou induzíveis) podem incluir, papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, camada de abscisão e tiloses, e os bioquímicos, fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese e espécies ativas de oxigênio. Estes mecanismos induzíveis são ativados quando a planta hospedeira reconhece os sinais enviados pelos patógenos (LEITE et al., 1997; PASCHOLATI; LEITE, 1995; (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; PASCHOLATI, 2011; RAMOS, 2015)

O processo de indução de resistência de plantas contra patógenos está relacionado com a ativação de um conjunto diverso de mecanismos de defesa. Inicia pelo reconhecimento do patógeno, que acontece por meio da ligação de um elicitor e um receptor presente na membrana plasmática da parede celular vegetal (Figura 15). Após o reconhecimento é iniciada a sinalização. A etapa seguinte à sinalização é a manifestação de respostas de defesa que são divididas em barreiras estruturais e barreiras bioquímicas (SILVA et al., 2008).

Figura 15. Esquema do sistema de defesa da planta quando infectado por um patógeno



Fonte: Slater et al., (2003)

A indução de resistência pode atuar no local da infecção ou nos tecidos tratados com o indutor, como também pode atuar de forma sistêmica, manifestando-se em outra parte da planta, longe do local de aplicação do indutor. Quando os mecanismos de defesa são ativados em outras partes distantes, imagina-se que deva existir algum tipo de sinal químico, bioquímico, ou de outra natureza que deve ter sua origem no sítio de indução enviando para locais mais distantes numa espécie de reação em cadeia (ROMEIRO, 2008).

A indução de resistência pode ocorrer em condições controladas e no campo, com vantagens de possuir um amplo espectro de ação contra vírus, bactérias, fungos e nematoides. Todavia, apresenta desvantagens porque a resistência é parcial e incompleta, com o tempo poderá ser necessário reativar a indução. Por outro lado, com a resistência parcial, é dificultada a resistência, já que não impõe pressão de seleção contra o patógeno. O efeito protetor pode durar poucos dias, semanas ou até a vida inteira da planta (PASCHOLATI, 2011).

Diversas alterações nas plantas podem ser observadas devido ao ataque de diferentes patógenos, com o objetivo de evitar a penetração e colonização do hospedeiro. Entre as quais se destacam os mecanismos bioquímicos. Após a planta sofrer algum tipo de estresse, ocorre à ativação de eventos como a síntese dos metabólitos secundários microbianos, espécies reativas de oxigênio e ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) como  $\beta$ -1,3- glucanases, quitinases e fanilalamina amônia-liases

Para o uso de eliciadores como protetores de plantas é importante selecionar compostos que causem um amplo espectro de respostas; não causem alterações no metabolismo primário da planta e garantam a proteção contra doenças (CLUZET et al., 2004).

Embora conhecido desde o início do século XX, este fenômeno biológico tem sido investigado com maior persistência somente nas últimas décadas. A indução de resistência é uma estratégia eficiente e alternativa para a proteção de plantas e mostra-se menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas (PAULERT, 2005).

Algas marinhas representam uma abundante e natural fonte de potenciais eliciadores. A indução de resistência foi constatada no trabalho de Chester, em 1933, que demonstrou que plantas inoculadas com um microrganismo atenuado ficavam protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros patógenos (STADNIK e MARASCHIN 2004).

Lizzi et al., (1998) observaram que a pulverização nas folhas com extrato da alga *Ascophyllum nodosum* reduziu significativamente ataques subseqüentes de *Phytophthora capsici* e *Plasmopara viticola* em pimenta e videira, respectivamente. Houve um aumento na atividade das peroxidases solúveis e na concentração de fitoalexinas, dois marcadores de resistência.

Aziz et al., (2003) mencionam que o beta-1,3-glucan laminarin derivado da alga marrom *laminaria digitata* mostrou ser um eficiente indutor de respostas de defesa em videira e efetivamente reduziu o desenvolvimento de *B. cinerea* e *P. viticola* em plantas de videira infectadas.

Os extratos de folhas de *Datura metel* reduziram significativamente o crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia solani* (e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Entretanto os autores verificaram em casa de vegetação que aplicações de pré-inoculação do extrato nas folhas foram melhores do que as aplicações pós-inoculação. A indução de resistência sistêmica ficou evidente a partir do aumento do acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e outros compostos relacionados à defesa foram observados em plantas de arroz após a aplicação do extrato de folhas de *D. metel* e inoculação com *R. solani* ou Xoo. (KAGALE et al., 2004).

Cluzet et al., (2004) verificaram que o tratamento prévio de *M. truncatula* com o extrato de *Ulva* spp. protegeu as plantas contra infecção subseqüente pelo fungo patogênico *Colletotrichum trifolii*. Os autores mencionam que quando infiltrado nos tecidos vegetais ou pulverizado nas folhas, o extrato de *Ulva* spp. induz a expressão do gene marcador PR10 relacionado à defesa sem provocar necrose.

O extrato de *L. digitata* é registrado e comercializado pela empresa Göemar com o nome de Iodus 40® (40 g de laminarana por litro) para induzir resistência contra doenças em trigo, tais como fusariose, oídio e septoriose. Esse produto não é fitotóxico e os custos energéticos para a planta, devido à indução de resistência, são baixos ou inexistentes (STADNIK e TALAMINI, 2004; PAULERT, 2005).

Resende et al., (2007) verificaram que extratos aquosos produzidos a partir de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) com sintomas de vassoura-de-bruxa induziram proteção de mudas de cacauzeiros (*Theobroma cacao*) contra a mesma doença em nível estatisticamente similar à proteção conferida pelo indutor de resistência padrão, acibenzolar-S-metil ASM. Quando se quantificou a atividade de proteínas relacionadas à patogênese (quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase) estimuladas pelo extrato aquoso e fervido de lobeira (*Solanum lycocarpum*) e ASM (como padrão), observou-se que ambos os tratamentos induziram maiores atividades de peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase em mudas de cacauzeiros, comparados às respectivas testemunhas, no período de 4 a 18 dias.

Observou-se uma redução de 65% na severidade da doença conhecida como mancha foliar da gala, causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira, quando a planta foi tratada com extrato da alga *Ulva* sp. (ARAÚJO et al., 2008).

Borsato, Di Piero e Stadnik (2010) avaliaram o potencial do polissacarídeo ulvana em induzir resistência à ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* em três diferentes cultivares de feijão carioca, apresentando níveis de resistência diversos. A pulverização do polissacarídeo ulvana não afetou o número de pústulas/cm<sup>2</sup> da ferrugem, mas promoveu uma redução média de 23,8% no diâmetro das mesmas em plantas de feijão.

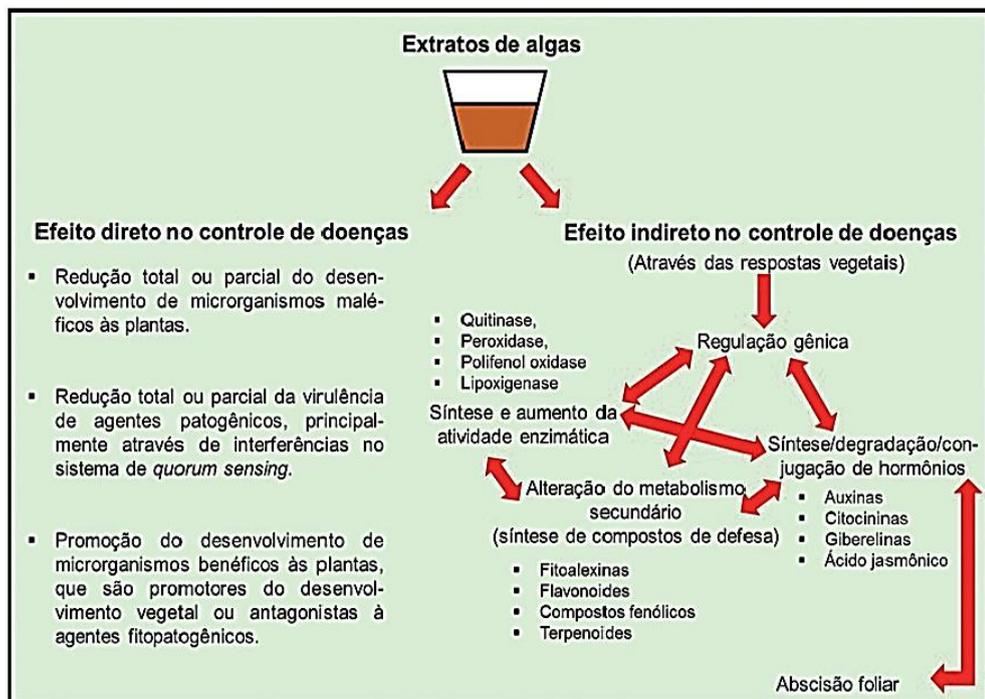
Akladios, et. al., (2015) analisaram a atividade antifúngica do extrato de manjeriço, contra o *Fasarium oxysporum* f. sp. *lycopersic* raça 3, o agente causal da murcha do tomateiro. Foi realizado o método de embebição das sementes para avaliar a indução do extrato contra o patógeno. As plantas foram colhidas aos 45 e 105 dias (estádio vegetativo e floração) após a semeadura. O tratamento com *O. basilicum* diminuiu a incidência da doença de 94,70 para 18, %.

## 2.4.2 Extratos de Algas no controle Bactérias e Fungos Fitopatogênicos

Segundo Smit (2004), a maioria dos compostos de macroalgas marinhas que apresentam atividades biológicas pertence à classe de lectinas, terpenos e polissacarídeos sulfatados. As macroalgas marinhas são organismos pluricelulares, eucariontes, autótrofos, sem sistema vascular e podem ser classificados em três grupos de acordo com a coloração. As algas vermelhas pertencem à divisão Rhodophyta, as marrons ou pardas, à divisão Phaeophyta, e as algas verdes, às Chlorophyta. Os parâmetros bioquímicos, morfológicos e reprodutivos levam-se também em consideração na classificação das algas, são cosmopolitas, portanto, encontram-se distribuídas em ambientes marinhos, corpos de água doce, solos, rochas, sobre a neve e superfície de vegetais; desde que haja luz e umidade suficientes (PÁDUA, 2004; SILVA, 2012).

Um amplo espectro de atividades biológicas são relatados às macroalgas (Figura 16), como atividade antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, aglutinante, capacidade de remover teores de chumbo de efluentes aquosos, utilização como suplemento para animais, incluindo humanos e ingredientes para ração de animais aquáticos cultivados (SILVA, 2009; SILVA, 2012; CALADO, et al., 2003).

Figura 16. Mecanismos hipotéticos de ação dos extratos de algas sobre o controle (direto e indireto) de doenças



Fonte: Carvalho; Castro (2014)

Bhosale et al., (1999), observaram que o extrato metanólico das algas *Amphiroa* sp. e *Poryphyra* sp. possui propriedades inibitórias frente a fungos fitopatogênicos *Aspergillus japonicus* e *A. niger*, respectivamente.

Extrato da alga marrom *Cystoseira tamariscifolia* apresentaram atividade inibitória frente aos fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* (ABOURRICHE et al., 1999).

Em pesquisa realizada em Florianópolis (SC) foi verificado que, após a aplicação de um produto à base de *Ulva* spp. (concentração de 50%), houve redução no número de pústulas de ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), na folha primária, primeiro trifólio e segundo trifólio dos feijoeiros (MARTINS, 2006).

A *Ulva fasciata* proporcionou redução da severidade da antracnose do feijoeiro, demonstrando um efeito residual com redução de 22% contra essa doença (ABREU et al., 2008).

A atividade inibitória de extratos aquosos e etanólicos de nove espécies de algas marinhas chilenas (*Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Durvillaea antarctica*, *Gracilaria chilensis*, *Porphyra columbina*, *Gigartina skottsbergii* e *Ulva costata*) foi testada sobre fungos e bactérias fitopatogênicas. As doses (100, 1.000, 5.000 e 10.000 ppm) e épocas de coleta (primavera, verão e outono) foram avaliados também. Apenas o extrato etanólico de *Lessonia trabeculata* (10.000 ppm) reduziu os danos causados por *Botrytis cinerea* em folhas de tomateiro em 95%, 93% e 72% quando coletado no outono, primavera e primavera-verão, respectivamente. A dose de 5.000 ppm também foi capaz de reduzir os danos (aproximadamente 80%) quando o extrato foi coletado no outono ou no inverno; revelando que o efeito é dependente da dose e da época de coleta para esta espécie. Extratos aquosos e etanólicos da alga vermelha *Gracilaria chilensis* previnem o crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, mostrando uma resposta dependente de doses e tempo de coleta. Verificou-se que ambos os extratos (aquoso e etanólico) da alga *Durvillea antarctica* (nas doses de 5.000 ou 10.000 ppm) reduziram os sintomas do vírus TMV (tobacco mosaic virus) em folhas de tabaco em até 95%, diminuindo o número e o tamanho das lesões (JIMÉNES et al., 2011).

Bhagavathy et al., (2011) verificaram que os extratos da alga verde *Chlorococcum humicola* apresentaram potente efeito sobre o crescimento de *A. niger* e *A. flavus*

Peres et al., (2012) avaliaram a atividade antifúngica de 10 espécies de algas marinhas *Styopodium zonale*, *Laurencia dendroidea*, *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum muticum*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus spiralis*, *Sargassum filipendula*, *Sargassum stenophyllum*,

*Laminaria hyperborea* e *Gracilaria lagenarium* sobre o controle dos patógenos *Colletotrichum lagenarium* e *Aspergillus flavus*. Os resultados evidenciam que os extratos de *S. zonale*, *L. dendroidea*, *P. canaliculata*, *S. muticum*, *A. nodosum* e *F. spiralis* inibiram significativamente o crescimento de *C. lagenarium*, porém, não significativamente, o do fungo *A. flavus*. Os autores afirmam que esse é o primeiro relato sobre a atividade de extratos de algas frente a *C. lagenarium*, fungo de importância agrícola.

Oliveira et al., (2017) avaliaram a atividade antifúngica do extrato etanólico obtido a partir de *Sargassum filipendula* contra o fungo *Monosporascus cannonballus* nos intervalos de 24, 48 e 72 h. O extrato evidenciou potencial inibitório ao fungo *M. cannonballus*, reduzindo o crescimento em 100%, 100% e 68,01% a 24, 48 e 72 h. Diante dos dados obtidos, os autores concluíram que o extrato etanólico de *Sargassum filipendula* inibiu eficientemente o fungo *Monosporascus canoballus*.

Borba (2017), avaliou o potencial de compostos bioativos e fermentados de algas marinhas (*Ulva fasciata*) no controle da Murcha de Fusarium do feijoeiro, e seu efeito na emergência de plântulas. A pulverização foliar de ulvana reduziu o progresso da doença comparado as plantas controle, mas não afetou a intensidade final no estágio de enchimento de vagens. Ulvana aumentou a emergência de plântulas em todas as condições testadas, mostrando ser um eficiente tratamento promotor de crescimento no feijão. O autor finaliza, enfatizando que o trabalho também fornece evidências de que a ulvana pode aumentar a emergência de plântulas em feijão.

Doze extratos etanólicos de diferentes espécies de macroalgas da costa central do Peru foram testados quanto à atividade antibacteriana, em estudo realizado por Magallanes et al., (2003). As algas *Gratelopuia doryphora*, *Prionitis decipiens* e *Ahnfeltiopsis durvillaei* (Rhodophyta), *Petalonia fascia* (Phaeophyta) e *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) apresentaram atividade antibacteriana frente às espécies clínicas *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Silva, (2012) avaliou a atividade antibacteriana de extratos hexânicos, metanólicos, acetônicos e etanólicos de macroalgas das classes Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta frente a víbrios isolados de ostras selvagens comercializadas em uma feira de pescado, e de hemolinfa de camarão, além de cepas padrões, com fatores de virulência, resistentes a antimicrobianos. A autora menciona que o álcool etílico foi o solvente mais eficaz na extração do composto ativo capaz de inibir o crescimento bacteriano; a *Padina gymnospora* foi a macroalga que apresentou a maior capacidade inibitória das espécies de *Vibrio* (57%) e as

maiores zonas de inibição, seguida pela *Ulva fasciata* (40%) e por último a *Hypnea musciformes* (30%); O menor valor de CIM encontrado foi com o extrato etanólico da *Padina gymnospora* contra *V. alginolyticus*.

Dapper et al. (2014) após realização de um trabalho de revisão, concluem que as macroalgas marinhas apresentam vantagens como o rápido crescimento e produção de grande volume de biomassa. As macroalgas verdes, marrons ou vermelhas presentes na extensa costa brasileira pode fornecer subsídios para uma agricultura orgânica, auxiliando na produção de áreas cultiváveis livres da contaminação com pesticidas, valorizando a utilização biotecnológica da biomassa marinha na geração de produtos alternativos para a agricultura.

### 2.4.3 Extratos de plantas no controle de Bactérias e Fungos Fitopatogênicos

Franzener, et al., (2003) objetivando realizar o controle alternativo de *Bipolaris sorokiniana* em plantas de trigo, utilizaram extrato aquoso da planta medicinal *Artemisia camphorata* (cânfora). Foi utilizado em bioensaios para avaliar seus efeitos fungitóxico (através da inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação de esporos) e indutor de resistência. O extrato aquoso de cânfora a 50% causou a inibição de 39% do crescimento micelial, sendo que a 10% já inibiu completamente a esporulação.

Faria et al., (2009), após ensaios *in vitro* e *in vivo*, relatam atividade fungitóxica na parte aérea da planta *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano), com potencial futuro de estudo para controlar *Sclerotium rolfsii*, preferencialmente, de maneira preventiva. O fungo *S. rolfsii* habitante do solo, polífago, pode causar podridão em raízes, colo de plantas jovens, em sementes, danos em plântulas, folhas e frutos.

Venturoso et al., (2011) avaliaram *in vitro* o potencial de extratos brutos aquosos de alho, arruda, canela, cravo-da-índia, cavalinha, eucalipto, hortelã, jabuticaba, melão de são caetano e nim na concentração de 20%. Os ensaios foram realizados com os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium solani* e *Phomopsis* sp. Observou-se que os meios de cultura contendo os extratos de cravo-da-índia, alho e canela apresentaram maior atividade antifúngica sobre os fitopatógenos, quando comparados aos demais extratos utilizados, destacando o extrato de cravo-da-índia, que inibiu completamente o desenvolvimento de todos os fitopatógenos testados.

Costa et al., (2011), avaliaram a ação do óleo essencial de (cravo-da-india) *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina*. A análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa possibilitou a identificação de eugenol (83,6%), acetato de eugenila (11,6%) e cariofileno (4,2%). O óleo essencial de cravo apresentou atividade fungicida na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. solani*, entretanto não demonstrou essa atividade sobre *M. phaseolina*. Esses resultados indicam perspectivas favoráveis para posterior uso do óleo de cravo no controle desses fitopatógenos na agricultura.

Camatti-Sartori, et al., (2011) avaliaram o efeito de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos em flores. Os fitopatógenos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. foram isolados de flores de *Gerbera* sp. e *Rosa* sp. com sintomas de doença. Foram avaliados os extratos acéticos e etanólicos de alecrim, cavalinha, gengibre, alho, camomila, louro, manjeriço, menta e eucalipto. Observou-se que o extrato etanólico de camomila inibiu em 52% o crescimento micelial de *Fusarium* sp. O fungo *Botrytis* sp. foi inibido com os extratos acéticos de alecrim, eucalipto e menta.

Ravikimar e Garampalli (2013) analisaram 39 extratos aquosos de plantas quanto ao potencial antifúngico contra *alternaria solani*, causando a queima precoce do tomateiro. Os resultados mostraram que 13 extratos reduziram significativamente o crescimento micelial do patógeno. Na concentração 4%, a inibição acima de 20% foi verificada por sete extratos: *Crotalaria trichotoma* (36,6%), *Citrus aurantifolia* (27,3%), *Azadirachta indica* (23,7%), *Polyalthia longifolia* (23,3%), *Datura metel* (21,3%), *Muntingia calabura* (20,09%) e *Oxalis latifolia* (20,09%). Na concentração de 2%, seis extratos apresentaram redução abaixo de 20%: *C. trichotoma* (16,6%), *A. indica* (10%), *Capsicum annum* (7,1%), *D. metel* (6,6%), *P. longifolia* (6,3%) e *C. aurantifolia* (5,5%). Os autores enfatizam que os extratos das plantas utilizadas na pesquisa têm potencial para serem desenvolvidos como fungicidas potentes na agricultura.

Mone et al., (2013) verificaram que o composto plumieride presente nas folhas de *Allamanda* (*Allamanda cathartica*) inibe o crescimento micelial de *Phomopsis vexans*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

Barros et al (2015) afirmam que os extratos de *Allamanda blanchetti* são capazes de atuar na redução da severidade dos sintomas da alternariose causada pelo fungo *alternaria*

*brassicicola* em mudas de couve-manteiga, podendo atuar tanto na ativação de mecanismos de defesa como pela ação antimicrobiana direta sobre o patógeno.

Brito e Nascimento (2015) avaliaram a atividade fungitóxica nas concentrações de 5, 15, 25, 35 e 45%, dos extratos vegetais de alho, citronela, gengibre e nim no controle *in vitro* de *Curvularia eragrostidis*. Os resultados evidenciaram que as concentrações de 5% dos extratos de gengibre e de nim foram eficientes na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Curvularia eragrostidis*. As utilizações de todos os extratos a partir da concentração de 25% apresentaram os maiores efeitos fitotóxicos nas análises *in vitro*, reduzindo o crescimento micelial, a esporulação, e germinação do fungo.

Peixinho et al., (2017) estudaram a ação dos extratos vegetais de Boldo Baiano (*Vernonia condensata*), Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora*), Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*) e Pau-ferro (*Caesalpinia férrea*), no controle da podridão seca da uva. Os resultados mostraram que extratos de Pau-ferro, Pata de vaca, Jurema preta e Boldo baiano com concentrações de 30% inibiram o crescimento micelial em 85,6; 83,3; 85,6 e 88,9%, respectivamente. Entretanto, os autores comentam que os extratos testados não foram eficientes para inibir a incidência e a severidade da doença.

Lorenzetti et al., (2017) testaram o efeito do extrato de alecrim nas concentrações de 0%, 1%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10% contra *Phytophthora* sp e *Fusarium solani*. Foi realizado ensaio *in vitro* a fim de analisar o crescimento micelial do fungo. Para a área final de colônia de *Phytophthora* sp. houve redução de até 84,71% pelo extrato. Para a área abaixo da curva de crescimento micelial a redução foi de até 98,65%. Para a área final de colônia de *F. solani* houve redução de até 65% pelo extrato de alecrim. Para a área abaixo da curva de crescimento micelial a redução foi de até 62,89%. Os autores mencionam que houve incremento para número de esporos por cm<sup>2</sup> de colônia, e que os resultados indicam o potencial antimicrobiano parcial do extrato de alecrim contra *F. solani* e ainda complementam que os resultados apontam o potencial antimicrobiano do extrato de alecrim.

Segundo Lorenzetti et al., (2018), o extrato de alecrim foi capaz de induzir a atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em colo e raiz de plantas de soja desafiadas com *M. phaseolina*, revelando a ação de eliciadores presentes neste extrato com efeito dose-dependente para a ativação desses mecanismos.

Bhardwaj e Laura (2009) testaram a ação antibacteriana de vinte extratos aquosos de plantas contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, organismo causal podridão da

podridão negra do repolho e couve-flor. *Camellia sinensis* apresentou o melhor resultado. Entretanto, *Acacia arabicae*, *Aegle marmelos*, *Acacia catechu*, *Achyranthus asper*, *Espargos racemosus*, *Azadirachta indica*, *Callistemon lanceolatus* e *Acacia farnesiana*, também mostraram o efeito inibitório da bactéria.

Pesquisa Realizados por Abo-Elyousr; Asran, (2009) no controle de *R. solanacearum* utilizando extrato de *Datura*, *Nerium* e *Galic*, demonstra que o extrato de alho exibiu a atividade antibacteriana mais forte contra murcha bacteriana *in vitro* e *in vivo*, seguida por *Datura* e depois por *Nerium*.

Balestra et al., (2009) realizaram pesquisa com extrato de cravo de *A. sativum* e frutos de *F. carica* contra as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* (*Pst*), *Xanthomonas vesicatoria* (*Xv*), e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Nos testes *in vitro* com linhagens bacterianas com densidade populacional de  $10^6$  e  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>, extratos vegetais de cravo de *A. sativum* e frutos de *F. carica* nas concentrações de 1 e 30%, respectivamente, mostraram melhores efeitos na concentração bacteriana de  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup>. Nos testes *in vivo* as cepas bacterianas foram testadas a  $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> os extratos de *A. sativum* e *F. carica* reduziram a incidência da doença em 58 e 30% e a gravidade da doença em 68 e 22%, respectivamente. Além disso, esses extratos vegetais resultaram em controle efetivo da doença de até 65% (*A. sativum*) e 38% (*F. carica*).

Extratos etanólicos de seis espécies de plantas invasoras foram testados por Arunachalam et al., (2010). Os resultados mostram que *Xanthomonas malvacearum* foi sensível aos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Acacia arabica*, *Achyranthes aspera*, *Calotropis gigantea*, *Ocimum canum* e *Tridax procumbens*. As observações de MIC revelaram que o extrato de *P. juliflora* apresentou alta atividade antibacteriana contra *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum*. Da mesma forma, o extrato de *A. arabica* foi ativo contra *X. malvacearum*, *P. solanacearum*, *X. campestris* e *P. syringae*. Dessa forma, os resultados inferem que os extratos de *Prosopis juliflora* e *Acacia aspera* são eficientes contra os fitopatógenos. Os autores salientam que os extratos das plantas utilizadas apresentaram atividade antibacteriana, e que análises fitoquímicas são necessárias para identificar os compostos bioativos responsáveis pela atividade antibacteriana.

Debertdt et al. (2012) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato aquoso de *Allium fistulosum* nas concentrações de 100, 50 e 25%, no controle da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Foi realizado tratamento pré-plantio do solo, *in vitro* em ensaio de inibição e experimentos *in vivo* em uma câmara de crescimento. Os resultados mostraram que:

*in vitro*, nas concentrações de 100 e 50% suprimiu o crescimento de *R. solanacearum*; no tratamento pré-plantio do solo com extrato de *A. fistulosum* significativamente reduziu as populações de *R. solanacearum*, nenhum patógeno foi detectado no solo após tratamento com extrato 100% do terceiro dia após a aplicação até o final do experimento; *A. fistulosum* também reduziu significativamente a incidência de murcha bacteriana de tomate.

A atividade antibacteriana de extratos aquosos de doze espécies pertencentes a sete famílias foi avaliada contra quatro bactérias fitopatogênicas economicamente importantes por Silva et al. (2016). Somente três extratos não foram ativos contra *Ralstonia solanacearum* e outros três extratos não foram ativos contra *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*, *Croton pedicellatus* e *Eugenia brejoensis* apresentaram amplo espectro do efeito inibitório.

Silva et al., (2017) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos alcoólicos de *Senna alata* sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e na redução da bacteriose em casa de vegetação. Os autores concluem que extrato alcoólico de folhas de *Senna alata* promove inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, enquanto o extrato alcoólico de vagens reduz a severidade da mancha bacteriana do maracujazeiro em casa de vegetação.

### **3 RESULTADOS**

## **ARTIGO 01**

**Understanding microbial pathogens:  
current knowledge and educational  
ideas on antimicrobial research**

FORMATEX  
Microbiology Series N°7

**Edited by**

Enrique Torres-Hergueta  
A. Méndez-Vilas

## Natural products from plants: an environmentally friendly tool to control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Botryosphaeriaceae)

Alexandre Gomes da Silva<sup>1,2\*</sup>, Clébia Maria Alves de Almeida<sup>3</sup>, Ana Paula Sant'Anna da Silva<sup>3</sup>, Juciara Carneiro Gouveia Tenório<sup>3</sup>, Fabíola Gomes da Silva<sup>3</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>3,3</sup>, Antônio Félix da Costa<sup>4</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>2,3</sup> and Vera Lúcia Menezes de Lima<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50.670-901, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Av. Francisco Lopes de Almeida s/n, Serroão, Campina Grande, PB 58.429-970, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50.670-901, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Agrônomo de Pernambuco, Av. General San Martin, 1371, Bongi, Recife, PE 50761-000, Brazil

\* Corresponding author: email: [agsilva@live.com](mailto:agsilva@live.com)

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causes the disease charcoal rot on a broad range of plants in many areas of the world. The fungus is responsible for economic losses in various crops. To face this burden, several alternatives of treatment have been used for control of the disease caused by *M. phaseolina* in plants, mainly by using chemical products that usually can affect human health and cause environmental damage. However, due to the side effects of chemicals, several scientists around world have been made several efforts as an attempt to develop new bioalternative techniques to control charcoal rot, thus trying to avoid the traditional chemical control. This review summarizes plant alternative compounds to chemicals, and cites sixty two plants with antifungal properties against *M. phaseolina*. The activities described in this review show that there are many plant extracts, essential oils and pure compounds that should undergo further studies to better understand whether they may be used, in the future, as a field biopesticide.

**Keywords:** Biopesticides; essential oil; plant extract; phytopathogenic fungi; bioactive compounds; botanical pesticides

### 1. Introduction

The fungi take an important part in the microorganism world. They might have benefit to sciences, industries and technology. Nevertheless, filamentous fungi appear to be a potential harm for humans, animals and crops. In fact, many of them are phytopathogenic and/or mycotoxigenic.

Plant pathogens are responsible for yield loss in many economically important crops and trees. Crop protection technologies which include herbicides, insecticides, fungicides as well as biotechnology products, help to control thousands of weed species, harmful insects and numerous plant diseases that affect crops. Without these important technologies of crop protection and pest control, the world food production would decline, substantial crop damage would take place, many fruits and vegetables would be in short supply, and the price of agro-food products would rise.

During the second half of the twentieth century, one of the major concerns in agriculture was focused on pollution originated by the extensive use of highly toxic agrochemicals such as pesticides [1,2]. Since the 1970s several studies have shown that, besides the harmful effects at the public health level, the use of pesticides have led to the emergence of phytopathogen resistance caused by the systematic use of a product [3]. As the presence of pathogens in crops of global economic importance is persistent, both industry and academy have increased their efforts in finding solutions to that problem.

However, pesticides have been linked with deleterious effects on environment and human health. Children exposed to pesticides have increased rates of leukemia and brain cancer (astrocytomas) [4], and pregnant women with exposure have higher miscarriage rates [5]. Pesticides may also damage the lungs and nervous system and cause cardiovascular congenital malformations [6, 7]. In nature, pesticides can easily contaminate the air, ground and water when they run off from fields; as a result, plant and animal life may be threatened.

Recently, there has been an increasing interest in phytopathogens control strategies with natural substances released by plants, namely allelochemicals (allelopathic compounds), rather than with chemical compounds [8, 9]. Thus, there are reasons to develop alternatives to conventional pesticides, alternatives that are of low environmental risk and present a lower risk of the development of pesticide resistance in the pathogen; a characteristic that will enhance durability of agriculture and environment.

Due to the ineffectiveness of chemical controls, natural products including plant extracts (PEs) and essential oils (EOs) present many advantages in terms of sustainability, mode of action and toxicity within an integrated management strategy for the disease [10], where biological control arises as an alternative challenge. Moreover, interest in secondary metabolites from PEs and EOs, as potential antimicrobial agents for use in crop protection, has increased during recent decades [11, 12].

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causes the disease charcoal rot on a broad range of plants in many areas of the world [13]. The fungus has a wide geographical distribution, and is especially found in tropical and subtropical countries with arid to semi-arid climates in Africa, Asia, Europe, and North and South America [14, 15, 16].

The lack of a known teleomorph has stalled its taxonomy over the years [17, 18]; however, a thorough phylogenetic study of 113 members of the family Botryosphaeriaceae using ribosomal DNA sequences was able to separate the genera *Macrophomina* and *Tiarosporella* [18]. *M. phaseolina* is very widespread across the world and poses a threat to crop production [19]. It is one of the most destructive plant pathogens in the tropics and subtropics, causing disease in a wide range of host plants [20], with the most common diseases being charcoal rot, damping-off [21], dry rot, wilt, leaf blight and ashy stem blight. In addition, *M. phaseolina* from different crops are cross-pathogenic [22]. The fungus is known to cause stalk rot or charcoal rot disease in more than 500 plant species worldwide in arid and water-deficient regions of the world [23], including grass species such as *Avena sativa*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*, legumes such as *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Phaseolus* spp. and *Vigna unguiculata*, and many other species of agricultural importance and of woody plants [24, 25]. It can survive for up to 15 years in the soil as a saprophyte [26, 27]. It survives in the soil mainly as microsclerotia that germinate repeatedly during the crop-growing season [28]. It is seedborne [29], found both on the seed coat and cotyledons [20], and causes charcoal rot by infecting the roots. Infected seeds produce infected seedlings that can transmit the pathogen into the fruit via the peduncle and so infect the seeds within the fruit, and augment the inoculum potential in the soil.

## 2. Methods

An extensive review of the literature was undertaken in different national and international scientific sources, such as Centre for Reviews and Dissemination (<http://www.crd.york.ac.uk/CRDWeb/>), The Cochrane Library (<http://www.thecochranelibrary.com>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), Scopus (<http://www.scopus.com/>), Lilacs (<http://lilacs.bvsalud.org/>), Scielo (<http://www.scielo.org/php/index.php>), Web of Knowledge (<http://apps.webofknowledge.com>), EMBASE and Scholar Google (<http://scholar.google.com.br>). Combinations of the following terms were used to search: “*Macrophomina phaseolina*” OR “antifungal activity” OR “antimicrobial activity” OR “antiphytopathogenic activity”. Manuscript selection was based on inclusion criteria: articles published in English, Spanish and Portuguese.

## 3. Taxonomy and Nomenclature

The taxonomic status of *M. phaseolina* (Figure 1) has been revised several times over the past 100 years. The genus *Macrophomina* was first established by Petrak (1923) with the description of *M. philippinensis* from the dried specimens of *Sesamum orientale* collected by G. M. Reyes in Philippines in 1921. However, the pycnidial state (microsclerotial state of the fungus was originally named *Macrophoma phaseolina* by Tassi (1901) and *Macrophoma phaseoli* by Maublanc (1905). Halsted (1890) described the sclerotial state (microsclerotial state) as *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler on sweet potato (*Ipomoea batatas*). Finally, Ashby (1927) critically examined and compared the type specimens of the fungus from beans with other related genera and established the binomial species *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) (Ashby, 1927). Later, Goidanich (1947) changed the binomial *Macrophomina phaseoli* to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., since the original specimen of *Macrophomina* was collected by Tassi in 1901. Hence, the two names, that is, *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby and *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. became widely accepted in the literature. Additional synonyms for *Macrophomina phaseolina* exist in the literature including *Sclerotium bataticola* (Taubenh, 1913), *Macrophoma cajani* P. Syd. and Butler (Sydow and Butler, 1916, Farr and Rossman 2010), *Macrophoma chorchori* (Sawada, 1916), *Macrophoma sesame* (Sewada, 1922) and *Tiarosporella phaseolina* (Tassi, Aa, 1981). An unconfirmed report (Mihail 1992) of a teleomorph of *M. phaseolina* naming it as *Orbilia obscura* (Ghosh et al. 1964) is also available. Currently, *M. phaseolina* (Tassi) Goid. 1947 is officially recognized as the correct taxonomic name (CMI description of pathogenic fungi and bacteria no. 275) with the sclerotial phase known as *Rhizoctonia bataticola* [30]. *Macrophomina* is a monotypic genus, composed of only one species, “*phaseolina*”. Despite the teleomorph being unknown in this pathogen, *M. phaseolina* is a member of the family Botryosphaeriaceae [18].

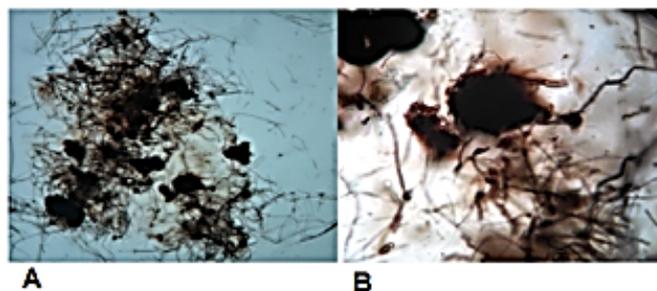


Figure 1

#### 4. Secondary metabolites as a tool for the control of *M. phaseolina*

The secondary metabolites in plants can be divided into different categories according to their biosynthetic principles [31, 32]. A simple classification includes three main groups (Figure 2) [32].

#### 5. Plant extract

Science ancient times, mankind has used plants to treat common diseases and some of these traditional medicines are still included as part of the habitual treatments of various maladies [33]. The activity of plant extracts may therefore make possible in the actually the design of less expensive alternatives on different sciences as agrobiotechnology, to be used by friendly by environment, to generate a change on using chemical compounds [34].

Initial screenings of plants for possible antifungal activities usually begin with crude aqueous or alcohol extractions, followed by various organic fractionation methods. The choice of extraction procedure depends on the nature of the source material and the compounds to be isolated. Since most of the identified components from plants active against microorganisms are aromatic or saturated organic compounds, they are most often obtained through initial ethanol or methanol extraction [21].

Indeed, plants constitute a powerful source of bioactive molecules usually synthesized in response to stress conditions and produce antibacterial, antiviral and antifungal effects [35, 36]. These secondary plant metabolites are often active against a small number of specific target microorganism species [37]. Furthermore, they are biodegradable to nontoxic products, not phytotoxic and are generally regarded as safe to mammals (GRAS) by the United States Food and Drug Administration [38]. Therefore, it becomes evident that these substances have enormous potential to improve the future agrochemical technology [37].

In Table 1, a compilation of the antifungal activity of plant extracts and/or isolated compounds shows properties against *M. phaseolina*. These extracts are alternatives that can be analyzed by agrobiotechnology to be efficient as antifungal on crop diseases and can be environmentally friendly with less secondary effects by health human. Research laboratories worldwide have found literally thousands of phytochemicals, which have *in vitro* inhibitory effects on *M. phaseolina* in different crops. Therefore, plant extracts in the form of decoction, infusion or tincture represent an important bioalternative by the population for treatment of diseases caused by *M. phaseolina* on different crops.

#### 6. Essential oil

Essential oils, also known as essences, volatile oils, etheric oils, or aetheroleum, are natural products formed by several volatile compounds [39, 40]. According to the International Standard Organization on Essential Oils (ISO 9235: 2013) and the European Pharmacopoeia [41] an essential oil is defined as the product obtained from plant raw material by hydrodistillation, steam distillation or dry distillation or by a suitable mechanical process (for *Citrus* fruits). Cold pressing without heat is usually used for *Citrus* fruit oils because their constituents are thermosensitive and unstable, converting into artifacts under heat and pressure. Moreover, essential oils are frequently associated with gums and resins that are separated by the distillation process [40].

The definition of an essential oil excludes other aromatic/volatile products obtained by different extractive techniques like extraction with solvents (concretes, absolutes), supercritical fluid extraction, and microwave-assisted extraction.

In nature, essential oils play very important roles in plant defense and signaling processes. For example, essential oils are involved in plant defense against microorganisms, insects, and herbivores, attraction of pollinating insects and fruit-dispersing animals, water regulation and allelopathic interactions [42; 43; 44]. In addition, they are valuable natural

products used as raw materials in many fields, such as pharmaceutical, agronomic, food, sanitary, cosmetic, and perfume industries.

In Table 2 are compiled the essential oils of different plants and the isolated compounds that were evaluated against the fungus *M. phaseolina*. Different studies have demonstrated the effectiveness of essential oils or their active compounds on a range of plant pathogenic bacteria and fungi responsible for preand postharvest diseases. Also, because of the increasing demand for effective, safe, natural products, quantitative data on plant oils and extracts and the resurgence of interest in natural control of plant infectious bacterial and fungal pathogens are required and could lead to a new antimicrobial agent, which could support the use of the plant to treat various infective diseases. Nonetheless, plant essential oils have several important benefits; they are superior for disease control, effective at very low dosages of even less than one gallon per acre, excellent in spreading and sticking properties on leaf surfaces and at low cost and have little or no toxicity to man and animals and have much lower level of risk to the environment than with current synthetic pesticides.

## 7. Concluding remarks

The need for increasing agricultural productivity and quality has led to an excessive use of chemical fertilizer, creating serious environmental pollution. The use of biopesticides is an alternative for sustaining high production with low ecological impact. This review records several results about the use of extract plants, pure compounds isolated from plants and essential oil that support their use in the treatment of phytopathogenic disease caused by *M. phaseolina*. In the reviewed literatures for the present study, 29 genus belonging to 22 plant families were investigated for antifungal activities against plant pathogenic fungi. Of these, Fabaceae (7 species), Asteraceae (5 species) and Lamiaceae (3 species) were the predominant families used by researchers.

**Acknowledgements** The authors acknowledge financial support from

**Table 1** Antifungal activity of plant extracts and/or pure compounds against *Macrophomina phaseolina*.

Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<b>Acanthaceae</b>					
<i>Azadirachta indica</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	9 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Justicia adhatoda</i> L. (Syn.: <i>Adhatoda zeylanica</i> Modk.)	Uninformed	Pakistan	Ethanol extract (EE)/ Leaves	Food poison technique; 300g/L; Inhibition of 25.09%	Aslam et al. 2010
<b>Apocynaceae</b>					
<i>Cathartus roseus</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Araceae</b>					
<i>Acorus calamus</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Rhizome	100 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Asteraceae</b>					
<i>Cirsium arvense</i>	Uninformed	Pakistan	Methanol extract (ME)/Leaf, Stem, Root and Inflorescence	ME Leaf 1% = ME Stem 1% = 6 ME Root 1% = 11 ME Inflorescence 1% = 2 ME Leaf 2% = 16 ME Stem 2% = 12 ME Root 2% = 16 ME Inflorescence 2% = 12 ME Leaf 3% = 29 ME Stem 3% = 22 ME Root 3% = 29 ME Inflorescence 3% = 12 ME Leaf 4% = 43 ME Stem 4% = 36 ME Root 4% = 32 ME Inflorescence 4% = 24 ME Leaf 5% = 74 ME Stem 5% = 57 ME Root 5% = 39 ME Inflorescence 5% = 30-	Banaras et al. 2017

Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research  
(Enrique Torres-Fargueta and A. Mendez-Vilas, Eds.)

5

<i>Eupatorium odoratum</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	74 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Eupatorium triplinerve</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Aerial part	24 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Mikania cordata</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Whole plant	15 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<i>Wedelia chinensis</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Whole plant	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Avicenniaceae</b>					
<i>Avicennia alba</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/Leaf	34 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Avicennia marina</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/Leaf	29 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Avicennia officinalis</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	36 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Brassicaceae</b>					
<i>Isatis ancatoria</i>	Ban-Lan-Gan		Ethanol extract (EE); 2-[Cyano(3-indolyl)methylamino]-3-indolone (compound 1); Epiglucoisatin (compound 2); 3-Hydroxyepiglucoisatin (compound 3); Sulfolglucobrassicin (compound 4); Isatan A (compound 5); Isatan B (compound 6)	Agar tube dilution method; 400µg/mL; EE = 61.0 compound 1 = 59.2% compound 2 = 79.5% compound 3 = 81.3% compound 4 = 56.7% compound 5 = 40.6% compound 6 = 30.9% Benzlate = 100% <sup>a</sup> Disc diffusion method	Ahmad & Fatima 2008  Al-Askar, Rashad & Abdulkhair 2014
<b>Burseraceae</b>					
<i>Boswellia serrata</i> Roxb. ex Colebr.	Uninformed	India	Gum	Poisoned food Technique; 1% = 129 5% = 115 10% = 139 Control = 132	Badar et al. 2012
<b>Capparaceae</b>					
<i>Capparis decidua</i>	Uninformed	Pakistan	Ethanol extract (EE)/ Leaves	Food poison technique; 300g/L; No inhibition in radial growth	Aslam et al. 2010
<b>Clusiaceae</b>					
<i>Garcinia cowa</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	18 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Combretaceae</b>					
<i>Anogeissus latifolia</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	6 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<i>Terminalia chebula</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Euphorbiaceae</b>					
<i>Sapintum indicum</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/Brank	21 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Dioscoreaceae</b>					
<i>Dioscorea aculeate</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/Aerial part	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Fabaceae</b>					
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Delile (Syn. <i>Acacia arabica</i> (Lam.) Willd.)	Uninformed	India	Gum	Poisoned food Technique; 1% = 130	Badar et al. 2012

Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research  
(Enrique Torres-Hergueta and A. Mendez-Vilas, Eds.)

6

<i>Acacia chundra</i> (Rottler) Willd.	Uninformed	India	Gum	5% = 131 10% = 136 Control = 132 Poisoned food technique; 1% = 132 5% = 134 10% = 139 Control = 132	Badar et al. 2012
<i>Aeschynomene americana</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Aerial part	7 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Butea monosperma</i> (Lam.) Taub.	Uninformed	India	Gum	Poisoned food Technique; 1% = 128 5% = 137 10% = 140 Control = 132	Badar et al. 2012
<i>Dalbergia sisoo</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	29 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Samanea saman</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	31 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Sarca indica</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Bark	29 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Lamiaceae</b> <i>Hypis suaveolens</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	47 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Lauraceae</b> <i>Litsea glutinosa</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<b>Lythraceae</b> <i>Lawsonia inermis</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	18 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Magnoliaceae</b> <i>Mitchella champaca</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Melastomataceae</b> <i>Melastoma malabathricum</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	0 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Meliaceae</b> <i>Azadirachta indica</i>	Uninformed	Pakistan	Ethanol extract (EE) Leaves	Food poison technique; 300g/L; No inhibition in radial mycelial growth	Aslam et al. 2010
	Uninformed	India	Gum	Poisoned food Technique; 1% = 127 5% = 134 10% = 138 Control = 122-	Badar et al. 2012
<b>Phyllanthaceae</b> <i>Phyllanthus emblica</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	18 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Piperaceae</b> <i>Piper betel</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	49 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Poaceae</b> <i>Cymbopogon flexuosus</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	20 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Cymbopogon osmazotii</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	17 % radial mycelial	Begum et al. 2007

Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<i>Oryza sativa</i> L. var. Basmati-385	Rice	Pakistan	Whole plant/ Aqueous extract (AE); Methanol extract (ME); n-Hexane extract (HE)	growth inhibition Nystatin = 71% AE 1% = -21 AE 3% = -52 AE 5% = -41 ME 1% = -04 ME 3% = -01 ME 5% = -05 HE 1% = -45 HE 3% = -60 HE 5% = -45	Bajwa et al. 2008
<i>Oryza sativa</i> L. var. Basmati-386	Rice	Pakistan	Whole plant/ Aqueous extract (AE); Methanol extract (ME); n-Hexane extract (HE)	AE 1% = -44 AE 3% = -21 AE 5% = -36 ME 1% = -01 ME 3% = -03 ME 5% = -04 HE 1% = -24 HE 3% = -49 HE 5% = -51	Bajwa et al. 2008
<i>Oryza sativa</i> L. var. Basmati Super	Rice	Pakistan	Whole plant/ Aqueous extract (AE); Methanol extract (ME); n-Hexane extract (HE)	AE 1% = -42 AE 3% = -41 AE 5% = -42 ME 1% = -01 ME 3% = -01 ME 5% = -05 HE 1% = -38 HE 3% = -18 HE 5% = -50	Bajwa et al. 2008
<b>Rubiaceae</b> <i>Hedyotis corymbosa</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Whole plant	12 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Paederia foetida</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Whole plant	17 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Rutaceae</b> <i>Citrus aurantiifolia</i> L.	Uninformed	India	Leaves/ Aqueous extract (AE)	Poisoned food technique 5% = 28 10% = 18 15% = 11 20% = 3 Carbendazim (0.1%) = 9	Balamrangan 2014
<i>Citrus grandis</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	7 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Micromelum minutum</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	42 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Salvadoraceae</b> <i>Salvadora oleoides</i> Decne.	Uninformed	Pakistan	Ethanol extract (EE)/ Leaves	Food poison technique; 300g/L; Inhibition of 17.92%	Aslam et al. 2010
<b>Sapindaceae</b> <i>Dodonaea viscosa</i>	Uninformed	Pakistan	Ethanol extract (EE)/ Leaves	Food poison technique; 300g/L; Inhibition of 52.06%	Aslam et al. 2010
Family/Species	Common name	Local	Extract/Compounds/Plant organ	Assay <i>In vitro</i>	References
<b>Solanaceae</b> <i>Datura metel</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	53 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Solanum filicifolium</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	14 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<b>Verbenaceae</b> <i>Clerodendrum viscosum</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	39 % radial mycelial growth inhibition	Begum et al. 2007

<i>Lantana camara</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	Nystatin = 71% 0 % radial mycelial growth inhibition	Begum et al. 2007
<i>Lippa javanica</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	Nystatin = 71% 19 % radial mycelial growth inhibition	Begum et al. 2007
Vitaceae					
<i>Cissus repens</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Aerial part	26 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
Zingiberaceae					
<i>Hedychium thyrsiforme</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Leaf	35 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007
<i>Zingiber zerumbet</i>	Uninformed	Bangladesh	Methanol 80% extract/ Aerial part	35 % radial mycelial growth inhibition Nystatin = 71%	Begum et al. 2007

Δ = Standard drugs; x = Plant name used by authors;

**Table 2** Antifungal activity of essential oil and/or pure compounds against *Macrophomina phaseolina*.

Family/Species	Common name	Local	Plant organ/Major active component	Assay ( <i>In vitro</i> )	References
Asteraceae					
<i>Artemisia nilagirica</i> var. Kunja		India	Aerial parts/ $\alpha$ -thujone (36.35%), $\beta$ -thujone (9.37%), germacrene D (6.32%), 4-terpinol (6.31%), $\beta$ -caryophyllene (5.43%), camphene (5.47%),	Poisoned food technique ED <sub>50</sub> = 93.23 mg L <sup>-1</sup> Bavistin = <20 mg L <sup>-1</sup>	Sati et al. 2013
<i>Eupatorium triplinerve</i>		Bangladesh	Aerial parts/ 2-tert-butyl-1,4-methoxybenzene (74.27%) and b-selinene (8.59%)	Minimum inhibitory concentration (MIC) assays EO 100 ppm = 85 EO 250 ppm = 88 EO 500 ppm = 89 EO 750 ppm = 90 Nystatin 1000ppm = 92 Nystatin 100 ppm = 71 (Percent radial growth inhibition)	Begum Bhuiyan, Tazmin 2010
Apiaceae					
<i>Carum carvi</i> L.	Caraway	Bangladesh	Seed/ Thymol (48.20%), o-cymene (19.29%), $\gamma$ -terpinen (17.61%), trimethylene dichloride (8.81%), $\beta$ -pinene (3.08%), 2-(1-cyclohexanyl) cyclohexanone (0.68%), $\beta$ -phellandrene (0.67%), 3-carene (0.57%), $\alpha$ -thujone (0.55%) and linalool (0.54%)	100 = 100% 250 = 100% 500 = 100% 750 = 100% Nystatin 100 ppm = 71% (Percent radial mycelial growth inhibition)	Begum et al. 2008
<i>Ferulago angulata</i> (Schlecht.) Boiss. "Chavir" or "Chavil"	"Chavir" or "Chavil"	Iran	Seed/ (Z)- $\beta$ -ocimene (19.93%), $\alpha$ -pinene (15.50%), p-cymene (7.67%), sabinene (7.49%) and $\beta$ -phellandrene (5.50%)	Disc diffusion 3 <sup>rd</sup> day 6 <sup>th</sup> day 100 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 41.93 $\pm$ 5.03 200 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 49.31 $\pm$ 5.85 400 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 73.04 $\pm$ 4.99 800 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 76.94 $\pm$ 4.75 100 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 30.64 $\pm$ 6.65 200 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 39.17 $\pm$ 4.38 400 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 47.42 $\pm$ 5.63 800 ( $\mu$ L L <sup>-1</sup> ) = 63.33 $\pm$ 3.51 Agar dilution 3 <sup>rd</sup> day 6 <sup>th</sup> day	Moghaddam et al. 2018

Family/Species	Common name	Local	Plant organ/Major active component	Assay ( <i>In vitro</i> )	References
<i>Geraniaceae</i> <i>Geranium viscosostemum</i>	Geranium		Geraniol, Citronellol, Tannins including gallic acid*	Fungal radial growth 1% = 48.3 2% = 56.3 4% = 95.5 <sup>A</sup>	Abdel-Kader, El-Mougy & Lashin 2011
<i>Labiatae</i> <i>Thymus vulgaris</i>	Thyme		thymol, carvacrol, geraniol, thymol methyl ether, $\alpha$ -pinene*	Fungal radial growth 1% = 43.3 2% = 53.3 4% = 97.5 <sup>A</sup>	Abdel-Kader, El-Mougy & Lashin 2011
<i>Lamiaceae</i> <i>Mentha piperita</i>	Peppermint		Menthol, menthone, menthyl acetate, viridiflorol, ledol*	Fungal radial growth 1% = 37.7 2% = 56.4 4% = 85.5 <sup>A</sup>	Abdel-Kader, El-Mougy & Lashin 2011
<i>Nepeta leucophylla</i> <i>Nepeta clarkii</i> <i>Umbelliferae</i>					
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Carnation		Eugenol, $\alpha$ -pinene, myrcene*	Fungal radial growth 1% = 72.2 2% = 100 4% = 100 <sup>A</sup>	Abdel-Kader, El-Mougy & Lashin 2011
<i>Carum carvi</i>	Caraway		Carvone, limonene, carveol, pinene, thujone*	Fungal radial growth 1% = 38.8 2% = 42.2 4% = 52.2 <sup>A</sup>	Abdel-Kader, El-Mougy & Lashin 2011
<i>Zingiberaceae</i> <i>Curcuma leucorhiza</i> Roxb	Uninformed	India	Rhizome oil: Germacrone (19.7%) and curdione (19.1%) Leaf oil: Curdione (19.5%), germacrone (9.6%), 1,8-cineole (7.4%), and camphor (7.2%)	Disc-diffusion assay Ineffective (no inhibition zone observed)	Devi et al. 2012

## References

- Prévost K, Couture G, Shipley B, Brzezinski R, Beaulieu C. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *BioControl*. 2006; 51(4):533-46.
- Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan A. Developing stress tolerant plants through in vitro selection - An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*. 2011; 71 (1):89-98.
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2009; 2(1):1-12.
- Shim YK, Mlynarek SP, vanWijngaarden E. Parental exposure to pesticides and childhood brain cancer: US Atlantic Coast childhood brain cancer study. *Environmental Health Perspectives*. 2009; 117: 1002-1006.
- Hertz-Picciotto I, Charles MJ, James RA, Keller JA, Willman E, Teplin S. In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology*. 2005; 16: 648-656.
- Cremonese C, Freire C, De Camargo AM, De Lima JS, Koifman S, Meyer A. Pesticide consumption, central nervous system and cardiovascular congenital malformations in the South and Southeast region of Brazil. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2014; 27: 474-486.
- Rallis GN, Boumba VA, Sakkas VA, Fragkouli K, Siozios G, Albanis TA, Vougiouklakis T. Residues of selected polychlorinated biphenyls (PCB) and organochlorine pesticides (OCP) in postmortem lungs from Epirus, Northwestern Greece. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2014; 77: 767-775.
- Khan MA, Afridi RA, Hashim S, Khattak AM, Ahmad Z, Wahid F, Chauhan BS. Integrated effect of allelochemicals and herbicides on weed suppression and soil microbial activity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Protection*. 2016; 90: 34-39.
- Saraf M, Pandya U, Thakkar A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiology Research*. 2014; 169: 18-29.

- [10] Nega A. Review on concepts in biological control of plant pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2014; 4: 33-54.
- [11] Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*. 2000; 19: 603-608.
- [12] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94: 223-253.
- [13] Reichert I, Hellinger E. On the occurrence, morphology and parasitism of *Sclerotium bataticola*. *Palestine Journal of Botany*. 1947; 6:107-147.
- [14] Gray FA, Kolp BJ, Mohamed MA. A disease survey of crops grown in the Bay Region of Somalia, East Africa. *FAO Plant Protection Bulletin*. 1990; 38:39-47.
- [15] Diourte M, Starr JL, Jeger MJ, Stack JP, Rosenow DT. Charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance and the effects of water stress on disease development in sorghum. *Plant Pathology*. 1995; 144:196-202.
- [16] Wrathler JA, Anderson TR, Arsyad DM, Tan Y, Ploper LD, Porta-Puglia A, Ram HH, Yorinori JT. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2001; 23:115-121.
- [17] Kulkarni NB, Patil BC. Taxonomy and discussion on the nomenclature of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby and its isolates from India. *Mycopathologia*. 1966; 28: 257-264.
- [18] Crous PW, Slippers B, Wingfield M J, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JL. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 2006; 55: 235-253.
- [19] Hoes JA. *Macrophomina phaseolina*: Causal Agent of Charcoal Rot of Sunflower and Other Crops. Morden, Manitoba, Canada: Agriculture Research Station. 1985.
- [20] Reuveni R, Nachmias A, Krikun J. The role of seedborne inoculum on the development of *Macrophomina phaseolina* on melon. *Plant Diseases*. 1983; 67: 280-281.
- [21] Cowan M. Plant products as anti-microbial agents. *Clinical Microbiology Review*. 1999. 12: 564-582.
- [22] Mishra B, Sinha SK. Studies on wilt of linseed caused by *Rhizoctonia bataticola*. *Indian Phytopathology*. 1982; 35: 555-557.
- [23] Das IK, Fakrudin B, Arora DK. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. *Microbiology Research*. 2008;163: 215-24.
- [24] Farr D F, Bills GF, Chamuris GP, Rossman AY. *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*. St. Paul, MN: APS Press; 1989.
- [25] Ali SM, Dennis, J. Host range and physiological specialization of *Macrophomina phaseolina* isolated from fields pea in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 1992; 32:1121-1125.
- [26] Indera K, Singh T, Machado CC, Sinclair JB. Histopathology of soybean seed infection by *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*. 1986; 76: 532-535.
- [27] Kaur S, Dhillion GS, Brar SK, Vallad GE, Chand R, Chauhan VB. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*. 2012; 38: 136-151.
- [28] Gupta GK, Sharma SK, Ramteke R. Biology, Epidemiology and Management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of Phytopathology*. 2012; 160: 167-180.
- [29] Kunwar I K, Singh T, Machado CC, Sinclair JB. Histopathology of Soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*. 1986; 76: 532-535.
- [30] Holliday P, Punithalingam E. *Macrophomina phaseolina*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 1970; 275:1-2.
- [31] Agostini-Costa TS, Bizzo VRF, Silveira HR, Gimenes D. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu DS, editor. *Chromatography and its applications*. Brazil: In Tech; 2012.
- [32] Samuelsson G, Bohlin L. *Drugs of natural origin*, 6th ed., Sweden: Apotekarsocieteten; 2009.
- [33] Alviano DS, Alviano, CS. Plant extracts Search for New Alternatives to treat microbial Diseases. *Courent Pharmaceutical Biotechnology*. 2009; 10:106-121.
- [34] Castillo FHD, Gallegos G, Mendez M, Rodríguez R, Reyes A, Aguilar CN. In Vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia Solani* Kün. *Industrial Crops and Products*. 2010; 32: 324-328.
- [35] Boudkhili M, Greche H, Bouhdid S, Zerargui F, Aarab L. In vitro antioxidant and antibacterial properties of some Moroccan Medicinal Plants. *International Journal of Pharmtech Research*. 2012; 4(2):637-642.
- [36] Abdolahi A, Hassani A, Ghosia Y, Bernousi I, Meshkatsadat MH. Study on the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of tabarzeh table grape. *Journal of Plant Protection Research*. 2010; 50(1):45-52.
- [37] Camele I, Altieri L, De Martino L, De Feo V, Mancini E, Gian Luigi Rana GL. In Vitro Control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13:2290-2300.
- [38] Talibi I, Boubaker H, Boudyach EH, Ait Ben Aoumar A. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*. 2014; 117:1-17.
- [39] Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 2001; 34:3-21
- [40] Baser KHC, Demirci F. Chemistry of essential oils. In: Berger RG (ed) *Flavours and fragrances—chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin; 2007. p. 43-86.
- [41] Council of Europe. *European pharmacopoeia*, 5th edn. Council of Europe, Strasbourg; 2004.
- [42] Harborne JB. *Introduction to ecological biochemistry*, 4th edn. Academic Press, London; 1993.
- [43] Bowscher C, Steer M, Tobin A. *Plant biochemistry*. Garland Science, New York; 2008.
- [44] Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*, 5th edn. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland; 2010.

## **ARTIGO 02**

## Phytochemical analysis and antiphytopathogenic activity of *penicillus capitatus* lam. (ulvophyceae; udoteaceae) extracts against plant pathogenic microorganisms

Alexandre Gomes Silva<sup>1,2,\*</sup>, Clébia Maria Alves de Almeida<sup>3</sup>, Juciara Carneiro Gouveia Tenório<sup>3</sup>, João Victor de Oliveira Alves<sup>3</sup>, Ana Paula Sant'Anna da Silva, Bruno de Oliveira Veras<sup>3</sup>, Rafael Matos Ximenes<sup>2</sup>, Vera Lúcia Menezes de Lima<sup>3</sup>, Elineide Barbosa de Souza<sup>4</sup>, Maria Tereza Santos Correia<sup>1</sup>, Márcia Vanusa Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil.

<sup>2</sup>Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Av. Francisco Lopes de Almeida s/n, Serrotão, Campina Grande, PB 58.429-970, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife – PE, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

\*Corresponding author: Alexandre Gomes Silva

E-mail address [agsilva@live.com](mailto:agsilva@live.com) or [alexandre.gomess@ufpe.br](mailto:alexandre.gomess@ufpe.br)

Fax number : +55 (81) 2126-8576

The chemical constituents of *Penicillus capitatus*, was successively extracted with petroleum ether, diclorometane, acetone and methanol and cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Broth microdilution method was used to study samples antimicrobial activities against six bacterial strains and six fungi. The phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, triterpenoids and phenolic compounds in all extracts. Volatile oils were present only in cyclohexane extract and other metabolites such as alkaloids, steroids, tannin, coumarins and saponins were absent. To phytopathogenic bacteria best results were shown by the cyclohexane extract against *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *malvacearum* and *X. campestris* pv *viticola*, whereas *Pectobacterium caravotorum* subsp. *caravotorum* showed more resistance to organic extracts of *P. capitatus*. For antimicrobial activity against phytopathogenic fungi best results were shown with hexane extract against *Fusarium solani*, whereas *Aspergillus flavus* showed more resistance to organic extracts of *P. capitatus*. This is first report of the effect of organic extracts of green alga *P. capitatus* against bacteria and fungi phytopathogens. Our investigations are an example of the potential for obtaining new sources of antimicrobial agents.

**Keywords:** Antimicrobial activity; algal extract; seaweeds; bioactive compounds; plant pathogens.

### 1. Introduction

Decrease in agricultural productivity can be attributed to a variety of reasons, however, pathogen infections plays a significant role in crop losses. As agricultural production has intensified over the past few decades, increased the use of agrochemicals, however, conventional chemical pesticides negatively adversely affect the environment and nontarget organisms. Bioactive natural compounds has represented great potential as alternative method of plant pathogen control [1].

The marine environment representing approximately half of the global biodiversity, consists of a rich diversity of chemical classes. Marine algae are known for their potential as a source of bioactive compounds. These chemical compounds have been reported as promising bioactivities, including the antimicrobial activity [2, 3]. Seaweeds are considered as diverse source of secondary metabolites characterized by a broad spectrum of biological activities. Some compounds showed cytostatic, antiviral, antihelminthic, antifungal and antibacterial activities from macroalgae [4]. Many biologically active important compounds such as alginate, carrageenans and agar as phycocolloids are isolated from seaweeds and used for medicinal purpose and some of them are under investigation for development of new drugs [5].

Harder [6] was the first to observe antimicrobial substance in seaweeds. Then until 1970s, no large scale screening of antimicrobial activity was carried out. The seaweeds are bestowed with varied source of bioactive natural products that exhibits antimicrobial properties against plant pathogens [7, 8, 9]. Although thousands of bioactive compounds have been discovered, the need for novel therapeutic compounds is still urgent in view of the emergence of a number of new diseases and the resistant strain of microorganisms. In agriculture, intensive application of synthetic pesticides caused damage to the ecological state of the agricultural system. Pesticides of biological origin are generally less toxic, affect only the target pest and closely related organisms and are effective in very small quantities which decompose quickly. Published literature reports on the diverse bioactivities of seaweeds, but the antibacterial efficacy of seaweeds against plant pathogens are comparatively a new concept and a few attempts have been made in this regard [7, 10]. The genus *Penicillus* Lam., one of the marine macroalgal genera belonging to the class Ulvophyceae, Udoteaceae Family, at present consists of 14 taxa at specific and infraspecific level. They are all distributed in tropical and subtropical regions and two species

are reported to Brazilian coast, *P. capitatus* Lam. and *P. pyriformis* A. Gepp ex E. Gepp. Only *P. capitatus* is widely distributed throughout the above tropical Atlantic area [11]. *P. capitatus* shows an antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, in a study realized in Yucatan, Mexico [12] while Soares *et al.* [13] found triacylglycerols and fatty acids as the major components in dichlorometane extract. *P. capitatus* showed high activity against HSV-1 virus. This genus had high concentrations of polysaccharides and fatty acids. These compounds may be responsible for the observed activity and indicate that this genus is an ideal target for investigating presence of biomolecules for various medical and industrial applications.

It is very urgent to identify alternatives to chemical pesticides for plant protection without sacrificing the productivity and profitability of agriculture. Due to the side effects of chemical pesticides, sustainable crop production through eco-friendly management is essentially required in the present scenario. Thus, the present study was aimed to explore the phytochemical constituents of different extracts of *P. capitatus* and yours antimicrobial activity against phytopathogenic and clinical microorganisms.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Collection of algal material

*Penicillus capitatus* was collected from Praia do Paiva, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco state, Brazil (08° 15' 10.50" S e 34° 56' 51.80" W) in March 2016. The algae were cleaned using brush for the removal of the epiphytes with distilled water. *P. capitatus* was air dried for two weeks at room temperature. The dried material was coarsely powdered and stored in polyethylene bag until it was used for screening. The seaweed was taxonomically identified at the Dárdano de Andrade-Lima Herbarium (IPA), from Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) and voucher specimens were deposited (IPA 91015).

### 2.2 Extracts Preparation

The powdered material (100 g) was successively extracted with different solvents with increasing polarity [cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol (Extraction 1) and petroleum ether, dichlorometane, acetone and methanol (Extraction 2)] and placed into the Soxhlet apparatus. The material was refluxed for about 36 to 48 hours until saturation and the resulting extracts were evaporated in a rotary flash evaporator. The obtained extracts were collected in a clean Petri dish and weighed.

### 2.3 Phytochemical profiling

The phytochemical screening of the extract was performed by thin-layer chromatography (TLC) on silica plates (60F254, aluminum backed, 200 µm layer thickness, 8.0 x 5.0 cm, Merck, Darmstadt, Germany). The presence of alkaloids, triterpenes, steroids, cinnamic acid derivatives, aglycone and flavonoid heterosids, hydrolysable tannins, and proanthocyanidins were investigated using the adequate development systems and revealers listed in Table 1 (Harborne, 1998). After development, the plates were air dried and sprayed with the revealers in a fume hood.

### 2.4 Microorganisms cultures

Plant pathogenic bacteria such as *Acidovorax citrulli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *malvacearum* and *X. campestris* pv. *viticola*, were sampled from the Culture Collection of the Phytobacteriology Laboratory of the Agronomic Department of Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil. All the tested bacterial species were maintained on nutrient yeast dextrose agar (NYDA). The six phytopathogenic fungi used during the growth experiments were as follows: *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus sotolonifer* and *Verticillium lecanii*. The samples of mycelium necessary for the *in vitro* experiments were taken from cultures grown in slants and kept at 26°C for 72 h on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco).

### 2.5 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by a microdilution broth susceptibility assay. Bacteria were cultured overnight at 30°C. The test samples of the extracts were dissolved in 10% DMSO. Dilutions were prepared in a 96-well microtiter plates to get final concentrations ranging from 0 to 50mg/ml. Finally, 20 µl of inoculum (10<sup>6</sup>CFU/ml) was inoculated onto the microplates and the tests were performed in a volume of 200 µl. Plates were incubated at 30°C for 24 h. The standard reference drug, chloraphenicol, was used as a positive control for the tested plant pathogenic bacteria. The lowest concentrations of tested samples, which did not show any visual growth after macroscopic evaluation, were determined as MICs, which were expressed in mg/mL. Using the results of the MIC assay, the concentrations showing complete absence of visual growth of bacteria were identified and 50 µl of each culture broth was transferred

onto the agar plates and incubated for the specified time and temperature as mentioned above. The complete absence of growth on the agar surface in the lowest concentration of sample was defined as the MBC. Each assay in this experiment was replicated three times.

#### 2.6 Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

A microplate method [14] was used with slight modifications to determine minimal inhibitory concentration (MIC) values of plant extracts. Plant extracts were serially diluted, ranging from 1/2 up to a 1/100 dilution from the crude extract. In each well, 100  $\mu$ L of each extract dilution was mixed with 100  $\mu$ L of the fungal spore suspension ( $2 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup> in fresh PDB). The microplates were incubated for 2-3 days at 27 °C with daily monitoring. All experiments were done in triplicate. The MIC readings were performed spectrophotometrically with a microplate reader at 595 nm. MICs values were calculated by comparing growth in control wells and the extract blank, which consisted of uninoculated plates. The MIC of the extracts was defined as the lowest concentration of plant extract that caused growth inhibition of more than 90% at 48 h, as compared to the control.

The in vitro fungicidal activity (MFC) was determined as described by [15]. After 72 h of incubation, 20  $\mu$ L was subcultured from each well that showed no visible growth (growth inhibition of over 98%), from the last positive well (growth similar to that for the growth control well), and from the growth control (extract-free medium) onto PDA plates. The plates were incubated at 27 °C until growth was seen in the growth control subculture. The minimum fungicidal concentration was regarded as the lowest extract concentration that did not yield any fungal growth on the solid medium used.

#### 2.7 Classification of antimicrobial activity

In this work, The MIC and MBC or MFC of the extracts were classified according to follows criteria: The activity was classified as high ( $\leq 12.5$ mg/mL), moderate (12.5 to 25 mg/mL), low (50 to 100 mg/mL) and very low (above 100mg/mL). The activity was classified as high ( $\leq 12.5$ mg/mL), moderate (12.5 to 25 mg/mL), low (50 to 100 mg/mL) and very low (above 100mg/mL).

#### 2.8 Evaluation of bactericidal/fungicidal and bacteriostatic/fungistatic capacity

The action of an antibacterial on the bacterial strains can be characterized at two parameters as Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) or Minimum Fungicidal Concentrations (MFC). According to the ratio MBC or MFC/MIC, we can apperceive antibacterial or antifungal activity. If the ratio MBC/MIC=1 or 2, effect is bactericidal but if the ratio MBC/MIC=4 or 16, effect is bacteriostatic.

### 3. Results and Discussion

In this report, we investigated the chemical composition of crude organic extracts of *P. capitatus*. The phytochemical analysis performed on eight extracts of *P. capitatus* revealed the presence of several secondary metabolites (Table 2). Flavonoids, triterpenoids and phenolic compounds were present in all extracts. Volatile oils were present only in hexane extract and others metabolites such as alkaloids, steroids, tannin, coumarins and saponins were absent in all extracts.

The antibacterial activity of *P. capitatus* extracts were examined against six bacterial phytopathogenic and six fungi phytopathogenic causing damage in major crops. The MIC tests of *P. capitatus* organic solvent extracts against 12 phytopathogenic microorgaisms were carried out using the microdilution technique. The MIC values of eight extracts ranged from 1.562 to 50 mg/mL (Table 3 to Table 6). To phytopathogenic bacteria the lowest MIC was for 1.562 mg/mL cyclohexane extracts against *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *malvacearum* and *X. campestris* pv *viticola*, whereas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* showed more resistance to organic extracts of *P. capitatus* with a MIC of 25 mg/mL (Table 3). The generally low activity of the extracts against the gram negative organisms may be due to the fact that gram negative bacteria possess an outer membrane and a periplasmic space, both of which are absent in gram positive bacteria. The outer membrane of gram negative bacteria is known to present a barrier to the penetration of numerous antibiotic molecules. In addition, the periplasmic space contains enzymes which are capable of breaking down foreign molecules introduced from outside [16]. When we looked for antimicrobial activity against phytopathogenic fungi the lowest MIC was for 6.25 mg/mL cyclo-hexane extract against *Fusarium solani*, whereas *Aspergillus flavus* showed more resistance to organic extracts of *P. capitatus* with a MIC of 50 mg/mL (Table 4). Padmakumar and Ayyakkannu [17] screened antifungal activities of 80 marine algal species and did not find a single algal extract was active against *Aspergillus flavus*. Similarly, Lavanya and Veerappan [18] reported that dichloromethane and ethanol extracts of *Sargassum dentifolium*, *Laurencia papillosa* and *Janio corniculata* had no activity against *Aspergillus flavus*.

The defined stringent end point criteria for "activity", suggest that extracts should be considered efficacious if they exhibit MIC values  $\leq 12.5$ mg/mL. In this context, all extracts from Extraction 2 showed high activity for phytopathogenic bacteria (Table 5 and 6). The n-hexane and methanol extracts, for *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*,

showed moderate activity (Table 3). To the antifungal activity, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts, from first extraction, to *Aspergillus flavus* showed low activity, and methanol extract (Extraction 1) to *Fisarium moniliforme*, *Rhizopus solonifer* and *Verticillium lecanii* showed moderate activity (Table 4). Other extracts showed high activity. To extracts from Extraction 2, approximately 40% showed moderate activity (Table 6).

It is difficult to correlate the antimicrobial activity of an extract to a compound class due to their complexity and variability. Nevertheless, researchers have reported on the relationship between the chemical composition of the extracts and their antimicrobial activity. These results indicate that bioactive molecules involved in the antimicrobial activity have different characteristics. The extracts obtained with different organic solvents contain compounds distributed according to their polarity. In line with our results, several works also reported antimicrobial activity in the different organic solvents [19, 20, 21, 22, 23, 24] which indicates the vast array of metabolites that can be involved in the antimicrobial activity.

Genovese *et al.* [25] reported that the marine biodiversity and associated chemical diversity constitute an unlimited reserve of bioactive substances in the field of bioactive products. Seaweeds provide a rich source of structurally diverse secondary metabolite. Several studies have demonstrated that seaweeds are an excellent source of components such as polysaccharides, tannins, flavonoids, phenolic acids, bromophenols, and carotenoids that exhibits different biological activities [5].

Investigations of antimicrobial chemical defenses in green algae of the genus *Penicillus* indicate that these abundant macroalgae also harbor potent defenses against fungal pathogens. From *P. capitatus*, Puglisi *et al.* [26] isolated two novel triterpene sulfate esters, capisterones A and B, with antifungal activity against *Lindera thalassiae* at natural whole-tissue concentrations. Engel *et al.* [27] screened seaweeds from Bahamas against marine pathogens and saprophytes. Among seaweeds screened, *P. capitatus* and *Halimeda copiosa* were the only to inhibit the growth of all assay microorganisms. Of the many active extracts identified in that survey, *P. capitatus* have thus far been chosen for further study. Different results were found by [12]. The authors conducted a screening against *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* and *Micrococcus luteus*. The organic extracts from *P. capitatus* were only active against *B. subtilis*.

Variation in antimicrobial activity of seaweed may be due to the method of extraction, solvent used in extraction and season at which samples were collected. Several different organic solvents have been used to screen algae for antimicrobial activity. Different solvents have been reported to have the capacity to extract different phytoconstituents depending on their solubility or polarity in the solvent [28].

The extracts used in this study, had stronger antibacterial than antifungal activities. The probable reason is the difference in the composition and permeability of their cell walls. The cell walls of gram-positive bacteria are made of peptidoglycans and teichoic acids, while the cell walls of gram-negative bacteria are made of peptidoglycans, lipopolysaccharides, and lipoproteins [29]. The lipid portion of the outer membrane of gram-negative bacteria is poorly permeable to antimicrobials, hence the reason for their greater resistance. The cell wall of fungi consists of polysaccharides such as glucan and chitin and it is poorly permeable. This observation is in accordance with many other studies, focused on antimicrobial activity which has demonstrated that structure and permeability of the cell wall are reasons for the different sensitivities in gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi.

In conclusion, this study indicates that *Penicillus capitatus* produces a high variability of compounds, some with high antimicrobial activity which makes them interesting for programs screening natural products. We found bioactivity in all extracts of *P. capitatus* against all microorganisms tested but *n*-hexane extracts was more active (lowest MIC). These results indicate the potential for obtaining new sources of antimicrobial agents. Further works will emphasize the isolation and characterization of active principles responsible for antimicrobial activity and action mechanisms of these green algae.

**Acknowledgments** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação – INSA/MCTI.

**Conflicts of Interest** The authors declare have not any conflicts of interest.

## References

- [1] Alam MZ, Braum G, Norrie J and Hodges DM (2014). Ascophyllum extract application can promote plant growth and root yield in carrot associated with increased root-zone soil microbial activity. *Can. J. Plant Sci.* 94: 337-348.
- [2] Supardy NA, Ibrahim D, Sulaiman SF, *et al.* (2012). Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 Cells by Hexane Extract of *Halimeda discoidea* (Decaisne) and the Identification of Its Potential Bioactive Compounds. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(6): 872-881.
- [3] Shannon and Abu-Ghannam (2016). Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanisms and Applications. *Mar. Drugs* 14(81):1-23.
- [4] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003). Natural products as source of new drugs over the period. 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66:1022-1037.
- [5] Pal A, Kamthania MC and Kumar A (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds — A Review. *Open Access Library Journal*, 1: e752. <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1100752>

Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research  
(Enrique Torres-Hargueta and A. Méndez-Vilas, Eds.)

- [6] Harder R (1917). Ernährungsphysiologische untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich am endophytische: Nostocpunctiforme. Z. Bot. 9:145.
- [7] Arunkumar K, Sivakumar SR (2012). Seasonal influence on bioactivity of seaweeds against plant pathogenic bacteri *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Hasse) Vauterin et al. Afr J Microbiol Res. 6 (20):4324-4331.
- [8] Ara J, Sultana V, Ehteshamul-Haque S, et al. (1998). Bioactivity of seaweeds against soil borne plant pathogens. Phytologi 85:292-299.
- [9] Kumar CS, Raju D, Sarada VL, Rengasamy R (2008). Seaweed extracts control the leaf spot disease of the medicinal plan *Gymnema sylvestre*. Indian J. Sci. Technol. 1:93-94.
- [10] Pane G, Cacciola G, Giacco E, Gian Mariottini L, Coppo E (2015). Assessment of the Antimicrobial Activity of Alga Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. Mar. Drugs 13: 6440-6452.
- [11] Guiry MD. In Guiry, M.D. & Guiry, GM (2015). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 17 August 2017.
- [12] Freile-Pelegrin Y and Morales JL (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. Bot. Mar 47: 140-146.
- [13] Soares AR, Robaina MCS, Mendes GS, et al. (2012). Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpe simplex virus. Rev. Bras. Farmacogn. 22(4): 714-723.
- [14] Eloff JN (1998). Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. J Ethnopharmacol. 60: 1-8.
- [15] Espinel-Ingroff A, Charuevedi V, Fothergill A and Rinaldi MG (2002). Optimal tenting conditions for determining MIC and minimum fungicidal concentrations of new established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborativ study. J. Clin. Microbiol. 40: 3776-3781.
- [16] Sofidiya MO, Odukoya OA, Afolayan AJ, Familoni OB (2009). Phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities o *Hymenocardia acida*. Nat. Prod. Res. 23(2):168-177.
- [17] Padmakumar K, Ayyakkarmu K (1997). Seasonal Variation of Antibacterial and Antifungal Activities of the Extracts o Marine Algae from Scutem Coasts of India. Bot. Mar. 40: 507-16.
- [18] Lavanya R, Veerappan N (2012). Pharmaceutical Properties of Marine Macroalgal Communities from Gulf of Manna against Human Fungal Pathogens. Asian Pac. J. Trop. Dis. 2: 5320-3.
- [19] Cosoveanu A, Oana A, Iacomi B. Antifungal activity of macroalgae extracts. Uasvm Bucharest, Series A LIII: 442-7, 2010
- [20] Galal HRM, Salem WM, Nasr El-Deen F (2011). Biological control of some pathogenic fungi using marine algae. Res. J Microbiol. 6: 645- 57.
- [21] Jimenez E, Dorta F, Medina C, et al. (2011). Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts. Mar. Drugs 9: 739-56.
- [22] Manivannan K, Karthikai DK, Anantharaman P, Balasubramanian T (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 1: 114-20.
- [23] Salem WM, Galal H, Nasr El-deen F (2011). Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red se (Hurghada, Egypt). Afr. J. Microbiol. Res. 5: 2160-7
- [24] Khalil AM, Daghman IM, Fady AA (2015). Antifungal Potential in Crude Extracts of Five Selected Brown Seaweed Collected from the Western Libya Coast. J. Micro. Creat. 1(1): 103.
- [25] Genovese G, Faggio C, Gugliandolo C, et al. (2012). *In vitro* evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. Mar. Environ. Res. 73:1-6.
- [26] Puglisi MP, LT Tan, PR. Jensen et al. (2004). Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillium capitatus* unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thalassiae*. Tetrahedron 60:7035-7039.
- [27] Engel S, Puglisi MP, Jensen PR and Fenical W (2006). Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marin plants against marine pathogens and saprophytes. Mar. Biol. 149: 991-1002.
- [28] Hediati MHS, Marraiki N (2010). Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. Saudi J. Biol. Sci. 17:57- 63.
- [29] Kosanić M, Ranković B, Stanojković T (2012). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species: J. Food Sci. 77: T20-T25.

**Table 1** Development systems and revealers used for analysis by thin-layer chromatography of secondary metabolites in *P. capitatus* extracts.

Secondary metabolites	Development system	Revealer
Alkaloids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H <sub>2</sub> O (100:11:11:26 v/v)	Dragendoff's reagent
Triterpenes and steroids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H <sub>2</sub> O (100:0.5:0.5:0.5 v/v)	Lieberman-Burchard's reagent
Aglycone and flavonoid heterosids	EtOAc/HCOOH/AcOH/H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Neu's reagent
Proanthocyanidins	EtOAc/HCOOH/AcOH/H <sub>2</sub> O (100:11:11:26 v/v)	Vanilin-chloridric acid
Cinnamic acid derivatives	EtOAc/HCOOH/AcOH/H <sub>2</sub> O (100:11:11:27 v/v)	Neu's reagent

Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research  
(Enrique Torres-Hargueta and A. Mendez-Vilas, Eds.)

**Table 2** Classes of secondary metabolites present in the organic extracts of *Penicillium capitatus*.

Chemical compounds	Extraction 1				Extraction 2			
	Cyclohexane	Chloroform	Ethyl Acetate	Methanol	Petroleum Ether	Dichloro Metane	Acetone	Methanol
Flavonoid	+	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkaloid	-	-	-	-	-	-	-	-
Coumarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Tanin	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenolic compounds	+	+	+	+	+	+	+	+
Volatile oils	+	-	-	-	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-	-	-	-	-

+Presence; - Absence

## **ARTIGO 03**

## Extracts From Leaves of *Allamanda blanchetti* Inducing Mechanism of Defense to Diseases in Sugarcane

Louise M. S. Oliveira<sup>1</sup>, Clebia M. A. Almeida<sup>2</sup>, Alexandre Gomes da Silva<sup>3,4</sup>, Bruno Oliveira de Veras<sup>1</sup>,  
 Fernanda Granja da Silva Oliveira<sup>2</sup>, Juciara Carneiro Gouveia Tenório<sup>1</sup>, Maria Tereza dos Santos Correia<sup>1,3,4</sup>,  
 Leonardo Sousa Cavalcanti<sup>5</sup>, Rildo S. B. Coelho (In Memoriam)<sup>6</sup> & Márcia Vanusa da Silva<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Nacional do Semiárido, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Campina Grande, PB, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>5</sup> Instituto de Pesquisas em Substâncias Bioativas, Universidade Federal do Vale de São Francisco, Juazeiro, BA, Brazil

<sup>6</sup> Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence: Márcia Vanusa da Silva, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil. Tel: 558-121-268-576. E-mail: marcia.vanusa@ufpe.br

Received: July 8, 2018

Accepted: December 15, 2018

Online Published: February 15, 2019

doi:10.5539/jas.v11n3p282

URL: <https://doi.org/10.5539/jas.v11n3p282>

### Abstract

This research aims to analyze the effect of the extract from a native plant from Caatinga, *Allamanda blanchetti*, in the induction of resistance mechanisms in a sugarcane variety smut-susceptible. Initially, it carried out a phytochemical analysis to know the main plant compounds used in this study. Diverse chemicals content in ethanolic extract from *A. blanchetti* were detected by thin-layer chromatography (TLC). Flavonoids, were more abundant compounds following by terpenes, stereroids and saponins. Under greenhouse conditions the sugarcane plants, SP-791011 (smut-susceptible), were sprayed with extracts from *A. blanchetti* extracted at cold at concentrations of 1000 ppm and acilbenzolar-S-metil (ASM) (100 mg/L). Leaves were collected at 0, 24 and 48 hours after spraying and used in the RT-PCR analysis for to identify the defense gene expression. Change in gene expression were observed in the different treatments, especially in the expression of pathogenesis-related (PR) genes. The extract of *A. blanchetti* induced an increase in the glucanase expression and was more effective than ASM inducer. *SNPRI* gene show increased in the two treatment. The results indicate that *A. blanchetti* extracts was able to activate the resistance mechanism as observed in resistant plants. This paper is the first report about the use of Caatinga natural plant extracts inducing resistance genes against *Sporisorium scitamineum* in sugarcane susceptible genotype.

**Keywords:** *Saccharum* sp., induced resistance, smut disease, plant extract, PR-genes

### 1. Introduction

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a major crop in Brazil and in many countries. It is one of the most important crop for the sugar production and renewable biofuel energy worldwide. The sugarcane production has been affected by many biotic and abiotic stresses, among them fungal diseases are one of the most important. Sugarcane smut is one of the most serious diseases of sugarcane. The disease is caused by the fungus, *Sporisorium scitamineum*, which infects plants through buds on standing stalks or germinating buds in the soil (Sundar et al., 2012; Sánchez-Elordi et al., 2016), can cause considerable yield losses and reductions in cane quality (Olweny et al., 2008). The best control method is to use resistant cultivars, which are widely available in different countries where sugarcane is grown (Chen et al., 2012), however, costs make this strategy expensive. Induced resistance (IR) can be activated in plants by several substances, preventing or delaying pathogen entry or its subsequent activity in plant tissues, by their own defense mechanisms. Several inductor agents can induce the production of "signals" in plant tissue, triggering reactions that will result in a long-term protection against a wide range of

plant pathogens. Perception occurs when inductor agents molecules bind to receptor molecules, probably located in the plasma membrane of the plant cell. These reactions trigger the activation of various defense mechanisms (Resende et al., 2007). These mechanisms may involve enzymes such as  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase and chitinase, among others. Plant extracts with bioactive substances may presents the capacity to act as resistance inducers (Barros et al., 2015).

Phytochemical screening is very important in identifying new sources of therapeutically and industrially important compounds like alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, saponins, steroids, tannins and terpenoids. Knowledge of the chemical constituents of plants is desirable because such information will be of value for the synthesis of complex chemical substances. Plant extracts that present bioactive substances may present the capacity to act as resistance inducer. *Allamanda blanchetii* is an ornamental plant of *Allamanda* genus in the Apocynaceae family. It is native plant of Caatinga, a semi-arid region of Brazil Northeastern, with a great diversity of plants and animals. Many active phytochemicals have been isolated from their leaves and roots (Sharmin et al., 2013; Mone t al. 2013; Savithramma et al., 2013). Several reports described the native plant extracts potential to control plant diseases (Barros et al., 2015; Dos Santos et al., 2015; Peixinho et al., 2017). Brazil's flora species present high potential as a source of bioactive substances for control of plant diseases. In light of the vast biodiversity of the Caatinga and the need to discover new bioactive compounds, it is fundamental importance to study the flora of this region, which has been insufficiently researched.

Therefore, the objective of this work was to study *A. blanchetii* potential extracts for the control of the fungus *S. scitamineum*, as inducer of mechanisms resistance in sugarcane and as natural fungicide, aiming to reduce the use of pesticides in this crop.

## 2. Methods

The experiment was conducted in a greenhouse at the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) and Biochemistry Laboratory of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil. The sugarcane cultivar SP-791011 (smut-susceptible), used in this experiment, was provided by Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A.-AGROVALE.

*A. blanchetii* leaves were collected from fields localized in the Afrânio city (Pernambuco, Brazil), at the geographical position 8°47'88" S and 40°93'79" W. The taxonomic identification was performed by Dr. Alexandre Gomes da Silva and a voucher specimen was deposited at the Herbarium IPA Dárdano de Andrade-Lima, Brazil (registration number 84112). Leaf tissues were dried in oven-dried at 40 °C for 72 h and then ground in a knife mill to obtain a fine and uniform powder. About 150 g of dried powdered leaves of the plant was subjected to maceration in cold 100% ethanol for 48h, with intermittent agitation. Then, the extract was filtered and the supernatant was concentrated in a rotary vacuum. This ethanolic extract was kept at 4 °C until the experiments for phytochemical analysis were done.

The phytochemical screening of the extract of *A. blanchetii* was performed by thin-layer chromatography (TLC), according to Harborne (1998), on silica plates (60F254, aluminum backed, 200  $\mu$ m layer thickness, 8.0  $\times$  5.0 cm, Merck, Darmstadt, Germany). The presence of secondary metabolites were investigated using the adequate development systems. After development, the plates were air dried and sprayed with the revealers in a fume hood.

Sugarcane plants, variety SP-791011, were grown in PVC pots containing 15 kg soil. The experiment was carried out in a greenhouse (29 °C and 70% RH) with 21 samples in randomized blocks and seven replications per treatment. At 105 days after germination was started applying the following treatments: (1) spraying with sterile distilled water (concentration 0); (2) spraying with crude extract of *A. blanchetii*, cold extraction, at concentration of 1000 ppm; (3) ASM (acilbenzolar-S-metil), at concentration of 100mg/l. ASM is one of the elicitors more used in the control of plant diseases through induction of resistance and it was used in this experiment for the purpose of comparison with the results of gene expression of *A. blanchetii*. Leaf tissues were collected at 0 h, 24 h and 48 hours after induction. Samples were maintained at -80 °C until processed. Total RNA was isolated from leaves using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of total RNA were measured by electrophoresis on 1.2% agarose denaturing gel and spectrophotometer, respectively. Aliquot of 5 mg of total RNA was used as a template for cDNA synthesis in RT-PCR analysis using the SuperScript® III kit (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Complementary DNA (cDNA) obtained at 0h, 24 h and 48 h of treatment was used to PCR amplification of PR genes. RT-PCR was performed under the following conditions: 50 °C for 30 min and 94 °C for 3 min, followed by 30 amplification cycles (94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min) and 7 min at 72 °C. The

primers used to amplification of the PR genes are listed in Table 1. The final amplification product was separated on a 1.2% agarose gel, visualized and analysed by L-PIX EX software (Loccus).

Table 1. Primers sequence used to amplification of the PR genes and their respective annealing temperatures

Primer	Sequence 5'-3'	Annealing temperature (°C)
Quitinase S	AGAAGATGAAGCGGAAGACG	59
Quitinase A	CCCCTGGGTIAGGTCCTTT	60
Glucanase S	CGAGTGAAAAGCAGGGACAG	60
Glucanase A	ATGTCGGAGTTGCCGTICT	59
PR5 S	AAACAAGGCAGAGCACCAAC	60
PR5 A	GGGCAGAAAGGTGACTTGGTA	60
Peroxidase S	AAAGGGTCTAGCGTCCAAT	59
Peroxidase A	ACATTGACGAAAGCAGTCGTG	59
SNPR1f	TGTCITTCATCGTCGTGCGT	59
SNPR1r	TCCCAGGTCTCCAAAACCGTGAT	61

### 3. Results

Phytochemical investigation of crude organic extracts of *A. blanchetti* leaves revealed the presence of several secondary metabolites. Flavonoids were more abundant compounds following by terpenes, steroids and saponins (Table 2). This results showed that plant extract contain molecules with potential for the application against smut disease. Others metabolites such as alkaloids, coumarins, quinones and reducing sugars were absent in the extracts. To investigate whether the defence-related genes are induced by crude extract of *A. blanchetti*, total RNAs from sugarcane leaves were extracted and analyzed by RT-PCR. The gene expression analysis shown that the inducers were efficient in activating a metabolic pathway of defense (Table 3). Inducers ASM and *A. blanchetti* extract, used in this study, were both effective in inducing resistance genes, however, they showed differences in the expression of the Glucanase 48 h after induction. Expression of this gene was significantly greater in the treatment with *A. blanchetti* extracts as compared to ASM inducer. Peroxidase and Chitinase genes was 2-fold expressed at 48 hours after inoculation. Same result was observed in the treatment with the asm inducer. PR-5 gene was 2-fold expressed only at 24 h with *A. blanchetti* extracts. SCNPR1 gene, activator of the metabolic route of defense, had expression increased over time (3-fold) in both treatments, not varying in control.

Table 2. Phytochemical profile of the organic extracts of the *A. blanchetti* leaves

Secondary metabolites	Standards	Development system	Inference
Flavonoids <sup>1</sup>	Quercetin, rutin	A	+++
Phenylpropanoids	Chlorogenic acid	A	-
Triterpenes	$\beta$ -sitosterol	B	++
Steroids	$\beta$ -sitosterol	B	++
Saponins	-	A	++
Monoterpenes and sesquiterpenes	Tymol	C	++
Coumarins	Coumarin	D	-
Quinones	Lapachol	D	-
Alkaloids	Pilocarpine	A	-
Condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins	Catechin	A	-
Hydrolyzable tannin	Gallic acid	E	+
Reducing sugars	Glucose	F	-

Notes. A, AcOEt:HCOOH:AcOH:H<sub>2</sub>O (100:11:11:27 v/v); B, Tolueno:AcOEt (90:10 v/v); C, Tolueno:AcOEt (97:3 v/v); D, CHCl<sub>3</sub>:MeOH (98:2 v/v); E, n-BuOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (40:50:10 v/v); F, n-BuOH-Me<sub>2</sub>CO-TF (pH = 5,0) (40:50:10 v/v). + trace; ++ present; - absent; +++ abundant; <sup>1</sup>3',4'-OH flavonoids (aglycones, mono-, di- and tri-glycosides).

Table 3. Expression of proteins in sugarcane (smut-susceptible) genotype SP-791011 in response to induction with ASM (acilbenzolar-S-metil) and *A. blanchetti* extract at 0, 24, and 48 hours after induction

PR-protein	Treatment								
	Control			ASM elicitor			<i>A. blanchetti</i> extract		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Glucanase	-	-	-	+	++	++	+	++	+++
Peroxidase	-	-	-	+	++	++	-	+	++
Chitinase	-	-	-	+	++	++	+	++	++
PR-5	-	-	-	-	-	+	-	++	+
ScNPR1	-	-	-	+	++	+++	+	++	+++

#### 4. Discussion

For investigate the sugarcane responses in the early stages, after application which elicitors, we performed phytochemical studies and assessed the resistance gene expression profile of smut-susceptible sugarcane genotype. Medicinal plants contain secondary metabolites, which often play an important role in plant defenses, and are capable of destroying or inhibiting the growth of microorganism (Sumathi & Anuradha, 2016). Antipathogenic properties of flavonoids result from their strong antioxidative properties. Their antifungal activity is based on the inhibition of spore development and mycelium hyphae elongation (Mierziak et al., 2014). The role of saponins in the plants serves an anti-feedant and to protect against phytopathogenic fungi (Koul, 2008). Essiett and Udo (2015), studied phytochemical screening of *Allamanda cathartica*. They found flavonoids was moderately present in the leaves, while saponins were present in traces in the leaves and flowers. Tannins were moderately present in the leaves, while terpenes were abundantly present in the stem, leaves and moderately present in the flowers. Like these cited reports, our analyzes revealed the moderate presence of tannins and saponins while flavonoids were more abundant. This indicates that the extracts of *A. blanchetti* were able to induce this compound which is correlated to the phytopathogenic defense mechanism.

Biological control is becoming increasingly important in integrated pest management programs, especially when discussing integrated production towards sustainable agriculture. Many plant and plant extracts have been reported to have antimicrobial properties against plant pathogenic fungi (Sharmin et al., 2013; Vergnes, 2014; Akladiou et al., 2015; Santos et al., 2015). *Allamanda* species extract has been proved as effective in controlling plant pathogenic fungi (Islam, 2004; Ravikumar et al., 2013; Basar et al., 2011; Mone et al., 2013; Barros et al., 2015; Brito et al., 2018). However, there is a small report available in the studies on detailed analyzes of leaf extract and its antifungal activity against plant pathogens. Nevertheless, it is reported that *A. blanchetti* have different bioactivities, and then further investigation is important to isolate the active principles to correlate with their biological activities.

In the initiation of the defense in plants are activated two main routes in the induction of systemic resistance: SAR (Systemic Acquired Resistance) and ISR (Systemic Induced Resistance), which promote the expression of PR proteins and is mediated by a salicylic acid-dependent process. ASM (benzo-(1,2,3)-triazazole-7-carbothioic acid Ester-S-methyl) is one of the most promising and most used inducers of resistance, which provides protection to a broad spectrum of pathogens. Providing increased resistance to diseases in many plant species, by their action similar to salicylic acid in the signal transduction pathway (Cruz et al., 2013). Studies shown that ASM induce the activity of 1,3- $\beta$ -glucanase, peroxidase and chitinase, confirming the involvement of these enzymes in the systemic acquired resistance. Plant  $\beta$ -1,3-glucanases are pathogenesis-related (PR) proteins, which belong to the PR-2 family of pathogenesis-related proteins and are believed to play an important role in plant defense responses to pathogen infection (Ebrahim et al., 2011). The pathogenesis-Related gene 1 (PR1) is particularly induced during defense response, being used as a marker for establishment of SAR in plants. The NPR1 protein (non-expressor of pathogenesis related gene 1) is a transcriptional co-activator and positive regulator of SAR, a long-lasting mobile defense signal found in plants. The *NPR1* gene has been cloned and characterized in Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) (ScNPR1). It has been shown to share an 83% sequence identity with NPR1 from maize (ZmNPR1), as well as display a very close relationship with NPR1 from banana (MdNPR1) (Pirnia, 2016). Chen et al. (2012) noted that resistant sugarcane plants in contact with the pathogen activates this gene to prevent infection by *S. scitamineum*.

Lao et al. (2008) examined differential expression proteins in sugarcane smut-susceptible and resistant varieties after inoculation with *S. scitamineum* at 0, 24 and 72 hours post inoculation. In the susceptible genotype PR-5

protein and Peroxidase were up-regulated only at 24 h whereas they were up-regulated in resistant at both 24 and 72 h post inoculation. Glucanase and chitinase were up-regulated only resistant genotype at 24 h and 72 h. In our study, with a susceptible genotype, glucanase and chitinase were expressed at different levels at 0, 24 and 48 h. This demonstrates that use of *A. blanchetti* extract as elicitor was able to induce defense genes in plants in response to sugarcane smut. Su et al. (2016) studied the response in sugarcane genotypes 0, 24 and 48 hours after inoculation with *S. scitamineum*. Most proteins, differentially expressed, were closely related to sugarcane smut resistance such as pathogenesis-related protein 1 (PR1), PR5, beta-1,3-glucanase and peroxidase. Glucanase expression, in the resistant genotype, was 2-fold (compared to control) at 24 h, decreasing its expression at 48 h. However expression level at 0 and 48 h were similar for both genotypes. Expression of PR1 was gradual over time and expressed for its intensity at 48 h in the susceptible genotype. Peroxidase was most expressed at 48 h (2-fold) in the resistant variety. Our results were similar to those cited above, however the expression of Glucanase was higher at 48h after induction with *A. blanchetti* extracts. Glucanase and PR1 are the most highly induced (3-fold) as compared to control.

Extracts from *Allamanda blanchetti* and the ASM resistance inducer presented similar responses regarding induction of resistance gene expression. Thus, it is understood that the elicitation of both PR-proteins and secondary metabolism products, such as phenolic compounds and their derivatives, by the application of natural products may contribute to the reduction of sugarcane plant diseases.

### 5. Remarks

Natural products play an important role in the search for new active drugs. Medicinal plants from Caatinga's environments have been the subject of various studies in the search for new antimicrobial compounds. Based on the results obtained with the present study, the natural extract of *A. blanchetti* possess antimicrobial substances that can inhibit the growth of the pathogenic fungi. It was able to activate the resistance mechanism in a sugarcane smut-susceptible genotype, increasing PRs and ScNPR1 genes expression. In addition, it presented expression levels similar to ASM resistance inducer, demonstrates potential to be used as elicitor of resistance for alternative control of infection by fungus diseases in sugarcane.

### Acknowledgements

This work was supported by Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Federal de Pernambuco. The authors thank the Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A.-AGROVALE.

### References

- Akladios, S. A., Isaac, G. S., & Ahmed Abo-tahon, M. (2015). Induction and resistance against *Fusarium* wilt disease of tomato by using sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extract. *Canadian Journal of Plant Science*, 95, 689-701. <https://doi.org/10.4141/cjps-2014-127>
- Barros, J. S. G., Gomes, E. C. S., & Cavalcanti, L. S. (2015). Effect of the *Allamanda blanchetti* extracts on the control of *Alternaria brassicicola* in seedlings of kale. *Revista Caatinga*, 28(3), 36-46. <https://doi.org/10.1590/1983-21252015v28n304rc>
- Basar, M. K., Alam, M. J., Ferdous, R., Khokon, M. A. R., & Meah, M. B. (2011). *Allamanda* tablet for controlling phomopsis blight and fruit rot of eggplant. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 7, 23-29.
- Bezerra Dos Santos, A. T., Araújo, T. F., Nascimento da Silva L. C., Silva, C. B., Oliveira, A. F., Araújo, J. M., ... Lima, V. L. (2015). Organic extracts from *Indigofera suffruticosa* leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 6(13), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00013>
- Brito, S. A., Almeida, C. L. F., Santana, T. I., & Oliveira, A. R. S. (2018). Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2-20. <https://doi.org/10.1155/2018/1731459>
- Chen, J. W., Kuang, J. F., Peng, G., Wan, S. B., Liu, R., Yang, Z. D., & Deng, H. H. (2012). Molecular cloning and expression analysis of a NPR1 gene from sugarcane. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1), 193-200.
- Cruz, M. F. A., Rodrigues, F. A., Polanco, L. R., Curvêlo, C. R. S., Nascimento, K. J. T., Moreira, M. A., & Barros, E. G. (2013). Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the

- soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction. *Bragantia*, 72(2), 162-172. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052013005000025>
- Ebrahim, S., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism: Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*, 130, 847-852. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.014>
- Essiett, A. U., & Udo, E. S. (2015). Comparative phytochemical screening and nutritional potentials of the stems, leaves and flowers of *Allamanda Cathartica* (Apocynaceae). *International Journal of Science and Technology*, 4(6), 248-253.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods* (3rd ed), Chapman & Hall, Londres.
- Islam, R. (2004). *Chromatographic separation of components in garlic bulb and Allamanda leaf extracts inhibitory to Phomopsis vexans* (Ph.D. Thesis. Mymensingh, Bangladesh Agricultural University).
- Koul, O. (2008). Phytochemicals and Insect Control: An Antifeedant Approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(1), 1-24. <https://doi.org/10.1080/07352680802053908>
- Lao, M., Arencibia, A., Carmona, E., Acevedo, R., Rodríguez, E., León, O., & Santana, I. (2008). Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports*, 27, 1103-1111. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0524-y>
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19, 16240-16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- Mone, M., Saieed, M. A. U., Dastogeer, K. M. G., Ali, M. A., & Meah, M. B. (2013). Plumieride from *Allamanda cathartica* as an inhibitory compound to plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47, 1311-1326. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.840103>
- Peixinho, G. S., Santos, C. M. G., Ribeiro, V. G., Amorim, E. P. R., Bispo, J. S., & Carvalho, V. N. (2017). Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. *Summa Phytopathologica*, 43(2), 155-157. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2166>
- Pirnia, S. (2016). *Novel plant DNA binding protein: Non-expresser of Pathogenesis Related 1 gene (NPR1) involved in disease resistance* (Ph.D. Thesis, Brock University St. Catharines, ON).
- Ravikumar, M. C., & Rajkumar, H. G. (2013). Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46, 1897-1903. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.780350>
- Resende, M. L. V., Costa, J. C. B., Cavalcanti, F. R., Ribeiro Júnior, P. M., & Camilo, F. R. (2007). Selection of plant extracts to induce resistance and activate defense responses in cocoa against witches' broom disease. *Fitopatologia Brasileira*, 32(3), 213-221. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000300005>
- Sánchez-Elordi, E., Baluska, F., Echevarria, C., Vicente, C., & Legaz, M. E. (2016). Defence sugarcane glycoproteins disorganize microtubules and prevent nuclear polarization and germination of *Sporisorium scitamineum* teliospores. *Journal of Plant Physiology*, 200, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.022>
- Savithamma, N., Linga, R. M., & Suhrulatha, D. (2013). Qualitative and quantification analysis of phytochemicals from leaf aqueous extract of *Allamanda cathartica* L. and *Terminalia paniculata* Roth. *Journal of Pharma Research*, 6(8), 821-825.
- Sharmin, T., Sarker, P. K., Islam, F., Chowdhury, S. R., Quadery, T. M., Mian, Y., ... Ullah, S. (2013). Investigation of biological activities of *Allamanda blanchetii*, the violet Allamanda. *Journal of Pharmacy Research*, 6(7), 761-764. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.07.010>
- Su, Y. C., Xu, L. P., Wang, Z. Q., Peng, Q., Yang, Y. T., Chen, Y., & Que, Y. (2016). Comparative proteomics reveals that central metabolism changes are associated with resistance against *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *BMC Genomics*, 17, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3146-8>
- Sumathi, R., & Amuradha, R. (2016). Phytochemical Screening and *in Vitro* Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Flowers of *Allamanda nerifolia* Hook. *International Journal of Pharmacognocny and Phytochemical Research*, 8(7), 1111-1117.

- Sundar, A. R., Ashwin, N. M. R., Barnabas, E. L., Malathi, P., & Viswanathan, R. (2015). Disease resistance in sugarcane—an overview. *Scientia Agraria Paramensis*, 4, 200-212. <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v14n4p200-212>
- Vergnes, S., Ladouce, N., Fournier, S., Ferhout, H., Attia, F., & Dumas, B. (2014). Foliar treatments with *Gaultheria procumbens* essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 5(477), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00477>

**Copyrights**

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

- A revisão acerca dos compostos naturais (extratos, óleos essenciais e/ou compostos purificados) no controle de *M. phaseolina* sistematizou um total de 59 espécies, distribuídas em 29 gêneros e 22 famílias, com Fabaceae (7), Asteraceae (5) e Lamiaceae (3) como táxons mais ricos. Torna-se urgente a pesquisa para a descoberta de novos compostos naturais para o controle de *M. phaseolina*;
- Os extratos orgânicos de *P. capitatus* (éter de petróleo, diclorometano, acetona e metanol, e ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) revelaram a presença de flavonóides, triterpenóides e compostos fenólicos em todos os extratos. Os óleos voláteis estavam presentes apenas no extrato de ciclohexano e outros metabólitos, como alcalóides, esteróides, taninos, cumarinas e saponinas estavam ausentes. Para as bactérias fitopatogênicas, os melhores resultados foram apresentados pelo extrato de ciclohexano contra *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *X. campestris* pv *malvacearum* e *X. campestris* pv *viticola*, enquanto *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* apresentou maior resistência aos extratos orgânicos de *P. capitatus*. Para atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos, os melhores resultados foram apresentados com extrato ciclohexânico contra *Fusarium solani*, enquanto *Aspergillus flavus* apresentou maior resistência aos extratos orgânicos de *P. capitatus*;
- O extrato de *Allamanda blanchetti* induziu um aumento na expressão da glucanase e foi mais efetivo que indutor ASM. O gene SNPR1 apresentou aumento nos dois tratamentos. Os resultados indicam que extratos de *A. blanchetti* foi capaz de ativar o mecanismo de resistência, como observado em plantas resistentes. Este é o primeiro relato sobre o uso de extratos de plantas da Caatinga induzindo genes de resistência contra *Sporisorium scitamineum* em genótipo suscetível à cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

- ABO-ELYOUSR, K. A. M.; ASRAN, M. R. Antibacterial activity of certain plant extracts against bacterial wilt of tomato, **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, n. 6, 573-578, 2009.
- ABOURRICHE, A. et al. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 611-614, 1999.
- ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2008.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.
- AKLADIOUS, S. A., ISAAC, G. S.; AHMED ABO-TAHON, M. Induction and resistance against *Fusarium* wilt disease of tomato by using sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extract. **Canadian Journal of Plant Science**, v.95, 689-701, 2015.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Soja Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Londrina, PR, maio, 2014.
- ALVES, A. O. et al. Colonization dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. **Tropical Plant Pathology**, v. 35 n. 6, p. 368-372, 2010.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15. 2001.
- ALVES, O. A.; CONCEIÇÃO, C.; XAVIER, A. DA S.; MARIANO, R. Survival of *Acidovorax citrulli* in infected melon tissues and in different edafoclimatic conditions **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n.5, outubro, 2018.
- AQUINIO, S. **Efeito da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente**. 2003, Dissertação (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares). Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2003. 89p.
- ARAÚJO, L. et al. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p.148-152, 2008.
- ARUNACHALAM, P.; SANKAR, M.; SUBRAMANIAN, B. Antibacterial activity of plant extracts against plant bacterial pathogens. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/283473889\\_Antibacterial\\_activity\\_of\\_plant\\_extract\\_s\\_against\\_plant\\_bacterial\\_pathogens](https://www.researchgate.net/publication/283473889_Antibacterial_activity_of_plant_extract_s_against_plant_bacterial_pathogens), acesso em: 27 de novembro de 2018.
- AZIZ, A., POINSSOT, B., DAIRE, X., ADRIAN, M., BE ZIER, A., LAMBERT, B., et al. Laminarin elicits defence responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v.16, n.12, p. 1118-1128, 2003.

- BAGGIO, J. S. **Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da Podridão Mole**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo - ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2012, 78p.
- BALANI, D. M. **Detecção e Identificação de *Xanthomonas citri* subsp *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – ESALQ /USP, Piracicaba, SP, 2009, 63p.
- BALESTRA, G. M.; HEYDARI, A.; CECCARELLI, D.; OVIDI, E.; QUATTRUCCI, A. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. **Crop Prot.** v.28, n. 10, p.807-811, 2009
- BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J. First Report of *Puccinia kuehnii*, Causal Agent of Orange Rust of Sugarcane, in Brazil, **Plant Disease**, United States, v.94, n.9, p. 1170, 2010.
- BARROS, J. S. G.; GOMES, E. C. S.; CAVALCANTI, L. S. Efeito de extratos de *Allamanda blanchetti* no controle de *Alternaria brassicicola* em mudas de couve-manteiga. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 3, p. 36 – 46, jul.-set. 2015.
- BATISTA, T. F. C. *et al.* Ocorrência de fungos e nematoides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM). **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, vl. 47, n. 1, p. 163-172, 2011.
- BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A.; DUARTE, V. Reação de Cultivares de Batata à Podridão Mole Causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi* **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 2, mar - abr 2004.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.13-33.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 332p.
- BESSA, C. M. A. **Isolamento, Caracterização e Aplicação de Metabólitos secundários de folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul (Fabaceae: Mimosoideae)** 2017. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- BHARDWAJ, S. K.; LAURA, J. S. Antibacterial activity of some plant-extracts against plant pathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Indian J. Agric. Res.**, v. 43, n.1, p. 26-31, 2009.
- BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola* - a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 7, 2011.

BHOSALE, S. H.; JAGTAP, T. G.; NAIK, C. G. Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 147, p. 133-138, 1999.

BILA, J.; MONDJANA, A. M.; MORTENSEN, C. N.; OLE S. L. Podridão negra de repolho (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em Moçambique: Estratégias para o manejo sustentável da doença: manual de campo. Danish Seed Health Centre for Developing Countries, University of Copenhagen. 2012

BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, v.1, n. 2, p.41, 1935.

BOLDINI, J. M. **Padronização de métodos para inoculação de *Sporisorium scitamineum* em testes de resistência ao carvão da cana-de-açúcar**. 2016. Tese (Agronomia) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2016, 60p.

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, 2005, p.11-28.

BORBA, M. C. **Compostos bioativos e fermentados de algas marinhas no controle da murcha de fusarium do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)** 2017. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2017

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 318-322, 2010.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm) Acesso em: 19 dez.2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2v, 2018.

BRETTAS, F. Z. **Exposição ao agrotóxico e perda auditiva: uma revisão**. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Especialização em Saúde do Trabalhador, da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC. Santa Cruz do Sul, 2016.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer *in vitro*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.2, p.230-238, 2015.

BUENO, C. R. N. C. **Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Bulletin OEPP/EPPO European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/127 (1) *Acidovorax citrullii* v. 46, n. 3 p.444-462 disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12330>, acesso em 20 outubro 2018.

CALADO, S. C. S. et al. Cinética e equilíbrio de biofixação de chumbo por macroalgas. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 31, n. 1, p. 53–62, 2003.

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

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 146, p.60-78, 2007.

CARVALHO FILHO, R. C.; MELLO, S. C. M. *Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle. Documentos 261. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2008.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. de C. Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. Série Produtor Rural n. 56, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Piracicaba, 2014

CAROLLO, E. M.; SANTOS FILHO, H. P. Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas Laboratório de Fitopatologia Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas- BA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Brasília, 1ª Edição, 2016

COELHO NETO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOHER, B. Caracterização de Isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de Tomateiros em várzea e em terra firme, no Estado do Amazonas. **Fitopatol. Bras.** v. 28, n.4, jul - ago 2003.

COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho. Circular Técnica, Embrapa 2008, 100 1-7.

COSTA, A. R.T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M. ; FIUZA, T. S. ; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. ; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.240-245, 2011.

DE BOER, S.H., VERDONK, L. & VRUGGINK, H. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. **Journal of Applied Bacteriology** 63:487-495, 1987.

DEBERDT, P.; PERRIN, B.; CORANSON-BEAUDU, C. Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. **Plant Disease**. n. 96, n. 4 May 2012.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S; BECKER, K. *Jatropha diterpenes*: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 3, p. 301-322, 2011.

- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166p.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Acidovorax citrulli: bacterial fruit blotch of cucurbits. 2013. Disponível em: <[http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert\\_List/bacteria/Acidovorax\\_citrulli.htm](http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.htm)>. Acesso em: dez. 2017.
- FARIA, F. A. de; BUENO, C. J.; PAPA, M. de F. S. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum. Agronomy** Maringá, v. 31, n. 3, p. 383-389, 2009.
- FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; AMORA, D. X. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA, A. K. N. (Ed). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas**. Panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308. p.
- FORMENTINI, H. M. **Avaliação de indutores de resistência biótico, abiótico e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. Tese (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná Campus Marechal Cândido Rondon, 2012, 90p.
- FRAGOSO, R. B. **Inoculação de *Sporisorium scitamineum* em cariopses de cana-de-açúcar para descarte antecipado de genótipos suscetíveis ao carvão**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015, 47f.
- 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, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.
- GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. CAMARGO, M. Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.171-176, 2001.
- GAÜMANN, E. **Pflanzliche Infektionslehre**. Base: Birkhauser, 1946, 611 p.
- GARMAN, H. A. A bacterial disease of cabbage. **Kentucky Agricultural Experiment Station**, v. 3 p. 43-46, 1894.
- GEISER, D. M. *et al.*, One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.
- GELLEN, L. F. A.; SILVA, E. H. C. Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima*. **J. Bioen. Food Sci.**, v.3, n.2, p.63-71, 201
- GOIDANISH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. nov. comb. nec. *M. phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annalidella Sperimentazione Agraria**, v. 1, p. 449-461, 1947.
- GOMES. C. J. A. ***Macrophomina phaseolina* em soja - padrão de ocorrência, danos e aspectos físico-químicos e biológicos do solo relacionados à doença**. 2014. Dissertação, Programa de Mestrado em Agronomia, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, 2014, 39f.
- GOMES, S. A. **Avaliação da toxicidade de extratos da alga *Laurencia dendroideae* e de *Azadirachta indica* (nim) e sinergismo entre o óleo de nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti***. 2012. Dissertação de Mestrado,

Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2012.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review Phytopathology*. **Palo Alto**, v. 32, p. 387-412, 1996.

HAUKSWORTH, D. L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 8<sup>a</sup> ed: CAB International, 1995. 616p.

LEHMAN, P.S.; MACHADO, C.C.; TARRAGO, M.T. Frequência e severidade de doenças da soja nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 183-193, 1976.

HENRIQUES, A.T., LIMBERGER, R.P., KERBER, V.A. E MORENO, P.R.H. (2004) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. *In*: SIMÕES, C.M.O., Schenkel. E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrocick, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 765-92. 2004.

JAMAL, C.M. O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós- colheita da banana. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, 4., 2008, Parla Mundi. Brasília, DF. EMBRAPA Cerrados, 2008. p.1-9. Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado, Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados, 2008.p. 1-9.

JAMES, G. L. Smut spore germination on sugarcane internode surfaces. **Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association**. Veracruz -June 1973

JIMÉNEZ, E.; DORTA, F.; MEDINA, C.; RAMÍREZ, A.; RAMÍREZ, I.; PEÑA-CORTÉS, H. **Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts**. **Marine Drugs**, Basel, v. 9, p. 739-756, 2011.

KAGALE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAN, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* V. 65, p. 91-100, 2004.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290- 1295, 1967.

KÖRBES, D.; SILVEIRA, A. F. DA; HYPOLITO, M. A.; Munaro, G. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. **Rev Soc Bras Fonoaudiol.** v.15, n.1, p.146-52, 2010.

KREYCI, P. F.; MENTEN, J.O.M. **A soja turbinada do plantio a colheita**. Caderno técnico cultivar soja.Limitadoras de produtividade Limitadoras de produtividade, USP São Paulo, revista Cultivar Grandes Culturas n° 167, Abril/2013. Disponível em: [http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt\\_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazi/solutions/fungicidas/caderno-limitadoras-de-produtividade](http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/pt_BR/function/conversions:/publish/content/APBrazi/solutions/fungicidas/caderno-limitadoras-de-produtividade) Acesso em: 16 agosto 2018.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. DE. **Tratado de Micologia Médica** Lacaz. Sarvier, 2002, 1.104p.

- LEITE, B. et al. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas-fungos patogênicos. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 5, p. 235-280. Passo Fundo-RS. 1997.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LAMPRECHT, S. RHEEDER, J. P. MARASAS, W. F. O. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology** v. 95, n. 3, p. 275-283, 2005.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL B. A. the *Fusarium* laboratory manual. Sydney. Blackwell, 388p., 2006.
- LEYVA-MADRIGAL, H. Y.; LARRALDE-CORONA, C. P.; APODACA-SANCHEZ, M. A.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; MEXIA-BOLANOS, P. A.; PORTILLO-VALENZUELA, S.; ORDAZ-OCHOA, J.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. *Fusarium* Species from the *Fusarium fujikuroi* Species Complex Involved in Mixed Infections of Maize in Northern Sinaloa, Mexico. **Journal Phytopathology**. v.163 p. 486-496, 2014.
- LIZZI, Y.; COULOMB, C.; COULOMB, P. J.; COULOMB, P.O.; POLIAN, C. L'algue face au Mildiou: que avenir? **Phytoma**, Paris, v.508, p. 29-30, 1998.
- LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.
- LOPES, C. A.; ROSSATO, M. Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 92, 10p., 2013.
- LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; LUIS PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.
- MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Rev. Peru Biol.**, v. 10, n. 2, p. 125-132, 2003.
- MALAVOLTA, JR. V. A.; ALMEIDA, I. G. M.; SUGIMORE, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES, NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. V. *Xanthomonas campestris* pv *viticola* em videira no estado do Piauí. **Summa Phytoathologica**, Jaboticabal, n. 25, n. 3, p. 27, 1999
- MALAFAIA, C. B. **Formação de biofilme, atividade antibiofilme de extratos vegetais e avaliação de métodos de extração de proteínas em fitobactérias**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônômica**, Recife. v.1, p.79-88, 2004.
- MARTINS, D. A. **Uso de extratos à base de algas para controlar a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro**. 2006. 41 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso em Engenharia Agrônômica) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

- MASSOLA JUNIOR, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos Fitopatogênicos. *In*: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4ª ed. São Paulo: Ceres, 2011. Cap. 8, p.149-206.
- MELO, E. A. de **Estrutura de População e caracterização filogenéticas de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do Estado de Pernambuco**. 2016. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2016.
- MELO, L. A. *et al.* Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: caracterização de isolados. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento EMBRAPA**, n. 70, p. 24, 2004.
- MELO, M. P. de. **Espécies Biológicas e Filogenéticas do Complexo *Fusarium Fujikuroi*** Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2014, 131p.
- MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. Factors affecting Charcoal rot of soybean seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 845-849, 1974
- MICHEREFF, J. S. Conceito e importância das doenças de plantas. [https://www.researchgate.net/publication/242704871\\_CONCEITO\\_E\\_IMPORTANCIA\\_DA\\_S\\_DOENCAS\\_DE\\_PLANTAS](https://www.researchgate.net/publication/242704871_CONCEITO_E_IMPORTANCIA_DA_S_DOENCAS_DE_PLANTAS) acesso em 13 de novembro de 2018.
- MONE, M.; SAIEED, M. A. U.; DASTOGEER, K. M. G.; ALI, M. A.; MEAH, M. B. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an inhibitory compound to plant pathogenic fungi. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 47, 1311-1326, 2013.
- MORETTI, A.; MULÉ, G.; SUSCA, A. GONZALEZ-JAÉM, M. T.; LOGRIECO, A. Toxin Profile, Fertility and AFLP Analysis of *Fusarium verticillioides* from Banana Fruits. **European Journal of Plant Pathology**. n. 110, n., p. 601-609, 2004.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.
- NASCIMENTO, A. R. P. **O Cancro Bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença**. 2005. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, 2005
- NDIAYE, M. Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. 114f. PhD Thesis Wageningen University, the Netherlands, 2007.
- NOTARO, K. A.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, C. A. D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associada à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, Sept./Oct. 2013.
- OLIVEIRA, N. S. de; COUTO JÚNIOR, J. R. S. do; Bárbara Monique de Freitas VASCONCELOS, B. M. de F.; SALES JUNIOR, R.; VAEZ, J. R. Atividade antifúngica do extrato etanólico da macroalga marinha *sargassum filipendula*. (Comunicação Oral) II Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER – PDVAgro, 2017.

- PÁDUA, M.; FONTOURA, P. S. G.; MATHIAS, A. L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 49-55, 2004.
- PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2011. 4. Ed. v.2, cap. 35, p. 593-636, 2011.
- PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 2005. 107f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- PAZ, M. *et al.* Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.
- PEARSON, C.A.; LESLIE, S.; SCWENK, F.W. Host preference correlated with chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 71, n. 9, p. 828-831, 1987
- PEETERS, N. *et al.* *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 7, p. 651–662, 2013.
- PEIXINHO, G. S., SANTOS, C. M. G., RIBEIRO, V. G., AMORIM, E. P. R., BISPO, J. S., & CARVALHO, V. N. Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasiodyplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, 43(2), 155-157. 2017.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, T. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatol. Bras.** v. 32, n.2, mar - abr 2007.
- PEREIRA, Á. I. S. *et al.* Atividade antimicrobiana no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educación química**, vl. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.
- PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R. DE; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L. O. S.; FELICIO, J. D. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 294-299, maio/jun., 2012
- PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R.; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L.O.S.; FELICIO, J.D. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 294-299, 2012.
- PIETERSE, C. M. J; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.4, n. 2, p.52-58, 1999.
- RAMOS, E. P. **Métodos alternativos no manejo da fusariose do abacaxizeiro ‘pérola’**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015. 42f.
- RAVIKUMAR, M. C.; GARAMPALLI, R. H. Antifungal activity of plants extracts against alternaria solani, the causal agent of early blight of tomato. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 2013.
- RESENDE, M. L. V. COSTA, J. DE C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; FABRÍCIO R. CAMILO, F. R. Seleção de Extratos Vegetais para Indução de Resistência e

Ativação de Respostas de Defesa em Cacaueiro contra a Vassoura-de-bruxa **Fitopatol. Bras.** v.32, n. 3, maio - jun ,2007.

RODRIGUES, E. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.28, n.2, p.213-220, 2006.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. *In*: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Eds.). Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba, SP, p.411-429, 2008.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos eliciadores de natureza bacteriana *in* BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Jaguariúma, Emprapa Meio Ambiente, 2009

RUSTON, I, Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence legislation and inactivation by physical methods. **Food chemistry.** v.59, n. 1, p.57-67, 1997.

SANGHA, J. S.; KELLOWAY, S.; CRITCHLEY, A.T.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweeds (Macroalgae) and 116 their extracts as contributors of plant productivity and quality: the current status of our understanding. *Advances in botanical research - sea plants*, v.71, p.189-213, 2014.

SANTOS, R. A. C. dos. **CARVÃO (*Sporisorium scitamineum*) e podridão-abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*) em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*): Uma revisão.** TCC (Trabalho de Conclusão de Curso) 2013. Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

SILVA, C. M. A. DA; COSTA, B. M. DA S.; SILVA, A. G. DA; SOUZA, E. B. DE; SILVA, M. V. DA; CORREIA, M. T. DOS S.; SANT'ANNA, A. P.; LIMA, V. L. de M. Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 17, p. 578-583, maio, 2016.

SILVA, C. T. B. da; ISHIDA, A. K. N.; LEMOS, W. P.; FREIRE, A. de N. R. Atividade antibacteriana de extratos de *Senna alata* l. roxb. Sobre a mancha bacteriana do maracujazeiro. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.25; p. 2017

SILVA, G. C. **Bioatividade de extratos algas frente a bactérias com fatores de virulência, resistentes a antimicrobianos.** 2012. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012, 60p.

SILVA P. M. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras.** 2009. 74f. Dissertação (Mestre em Ciências (Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SILVA, R. A. dá; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de planta contra o ataque de fitopatógeno. *Emprapa Agrobiologia. Documentos* 250, 2008, 49p.

SILVEIRA, B. R. **Mapeamento de QTLs para resistência a *Sporisorium scitamineum* em população bi-parental de cana-de-açúcar.** 2016 Dissertação (Pós-Graduação Em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados. Universidade Federal De São Carlos, 2016.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. Plant disease resistance. *In*: SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant biotechnology: The genetic inoculation of plants.** New York: Oxford, 2003, p. 157-178

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245-262, 2004.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis, p. 221-244, 2004.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis, p. 55-57, 2004.

STICHER, L.; MAUCH, M. B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. Palo Alto-USA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M.; CHITARA, L. G. Manejo de doenças do algodoeiro. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. (Org.) **O Agronegócio do Algodão no Brasil**. 2 eds. (vol.2). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2008, p. 983-1032.

TEBALDI, N. D.; MOTA, L. C. B. M. Ocorrência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em pseudocaule da bananeira em Minas Gerais. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 40, n. 2, p. XX-XX, 2014.

TINOCO, M. L. P. **Licenciamento trans-específico *in vivo* entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides***. 2009. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar *Ustilago scitaminea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.9, p. 98-110, 1983.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar: etiologia e medidas de controle. **Revista da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**. Piracicaba, ATAB, v.4, p. 26-34, 1985.

TOKESHI, H. Avaliação de perdas pelo carvão da cana-de-açúcar. n. 15, 1987, 26 p. (Coleção Sopral).

TOKESHI, H.; RAGO, A. M. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, v. 2, cap. 21, p. 185-196, 2005.

TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. Anuário Brasileiro da Fruticultura. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 88p, 2016.

TRINDADE, L. C. da. **Diagnose molecular do cancro bacteriano da viera causada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2007. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2007, 186p.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011

VENTUROSO, L. R. **Extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos à soja.** 2009. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal da Grande Dourados, 2009, 99p.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R. Estimates of diseases effects on soybean yields in the United States 2003-2005. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 173-180, 2006.

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, D.L.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 107-110, 1997.

YULIAR; NION, Y. A.; TOYOTA, K. Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 1, p. 11, 2015.

YABUUCHI, E. et al. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to *Ralstonia* genus nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb.nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.

ZANARDO, N. M.T. **Purificação parcial de frações de *Sacharomyces cereviae* indutora de resistência contra antracnose e a avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos®) e abiótico (Bion®) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematoide (*Meloidogyne incógnita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja).** 2009. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros” – Universidade de São Paulo, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, 2009, 98p.