

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO

TAMIRES CORRÊA DE ARAÚJO

EFEITO DE TEMPERATURA, FOTOPERÍODO E SENSIBILIDADE DE *Phomopsis amygdali* A DIFERENTES PRODUTOS, *IN VITRO*.

PONTA GROSSA

2014

TAMIRES CORRÊA DE ARAÚJO

EFEITO DE TEMPERATURA, FOTOPERÍODO E SENSIBILIDADE DE *Phomopsis amygdali* A DIFERENTES PRODUTOS, *IN VITRO*.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração Agricultura.

Orientador: Prof^a Dr^a Maristella Dalla Pria

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A658 Araújo, Tamires Corrêa de
Efeito de temperatura, fotoperíodo e
sensibilidade de *Phomopsis amygdali* a
diferentes produtos, in vitro/ Tamires
Corrêa de Araújo. Ponta Grossa, 2014.
70f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia -
Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof^a Dr^a Maristella Dalla
Pria.

1. *Prunus persica*. 2. Cancro do pêssego.
3. Controle alternativo. 4. Controle
químico. 5. *Fusicoccum amygdali*. I. Dalla
Pria, Maristella. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Agronomia. III. T.

CDD: 632.96



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Efeito de temperatura, fotoperíodo e sensibilidade de *Phomopsis amygdali* a diferentes produtos in vitro”.

Nome: Tâmires Corrêa de Araújo

Orientador: Maristella Dalla Pria

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maristella Dalla Pria

Profa. Dra. Louise Larissa May de Mío

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Data da Realização: 07 de agosto de 2014.

DEDICATÓRIA

A Deus pelo presente supremo da vida e pelas oportunidades nela concedidas.

Ao meu pai Adélio Corrêa de Araújo (*in memorian*) o qual foi exemplo de caráter, dedicação e inteligência.

A minha mãe Cesília de Souza Araújo (*in memorian*) que me deu amor incondicional e foi exemplo de fé e perseverança.

Ao meu irmão Denis Corrêa de Araújo (*in memorian*) que apesar de todas as eventualidades o amor permaneceu inabalável.

A minha irmã Neuza Corrêa de Araújo por me presentear com tanto amor e carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças pra seguir nesta grande luta que está apenas começando.

Aos meus pais Adélio Corrêa de Araújo (*in memorian*) e Cesília de Souza Araújo (*in memorian*) pela vida, pela educação, pela confiança e pelo amor. A pessoa que me transformei hoje é mérito de vocês, por isso têm todo meu respeito e orgulho.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela estrutura e dedicação durante o desenvolvimento do trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro.

Aos meus irmãos Neuza Corrêa de Araújo e Denis Corrêa de Araújo (*in memorian*) pelo carinho.

Agradecer a quem colaborou para realizar este trabalho não é uma obrigação, e sim uma enorme satisfação, pois sei que não estou sozinho, até porque não se faz nada sozinho. Para concluir o curso tive a colaboração de muitos, porém, quero agradecer de forma especial as seguintes pessoas:

A Prof. Dra. Maristella Dalla Pria por estar presente na orientação de trabalhos e me auxiliar de inúmeras formas. Se importar com o próximo foi um diferencial. Esse agradecimento vai principalmente para ela e minha irmã, pois as pessoas que gostaria de também agradecer não estão mais aqui conosco. Em suma, agradeço pela grande ajuda, pela compreensão e dedicação.

Ao pessoal do laboratório de Fitossanidade que é com certeza o laboratório mais animado do Brasil. Luciane Henneberg e Zima Richter, Daiane Trojan, Mônica Harms, Monica Jasper, Gislaine Gabardo, Carlos Eduardo C. Truylio e Camila Basso, obrigada pelos momentos inesquecíveis ali vividos. Agradecimento especial também ao casal Filipe Jacques e Hagata Hennipman, obrigada pelas diversas ajudas, conselhos e por ouvir meus desabafos! Estarei sempre aqui por vocês.

Sou muito grata também ao Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho e sua orientada Msc. Edilane Grabicoski pela grande ajuda no trabalho realizado, compartilhando o conhecimento e norteando meus objetivos.

Agradeço ao Prof. Dr. Domingos S. Nunes do Departamento de Química da UEPG e a mestre Lorna H. Name pelo trabalho realizado em conjunto.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram do meu processo de formação no mestrado. Obrigada!

Decisão e obras

Apressa-te homem!

O perto será longe
e o longe será perto
Se amanhã for ontem
Ou amanhã for já hoje!
O tempo são obras!

Calma.

Torna-se necessário remover muitas pedras
antes de se poder iniciar a obra projetada.
São precisos muitos homens,
alavancas,
zorras,
persistência contra a resistência...

Calma?

quanto tempo perdido,
quanta solução adiada,
por minguagem de coragem?!
E se nos decidíssemos já
e assentássemos a primeira pedra?
– À unha rapazes!
– Agarrem-se bem!
– Eh, que vai!
– Alto, já está!

Do trabalho decidido de todos os dias
só poderão brotar ricas florestas!

Álvaro Duarte

RESUMO

A produção de pêsegos no Brasil vem sofrendo danos na produção devido à queima dos ramos causado pelo fungo *Phomopsis amygdali*. Através de experimentos *in vitro*, estudaram-se, inicialmente, as melhores condições de temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento do patógeno. Posteriormente, sob as condições encontradas, o fungo foi submetido a diferentes substâncias: óleos essenciais vegetais (eucalipto, cravo, orégano, menta, gengibre, capim-limão, citronela, alecrim e camomila); diferentes produtos da extração da planta *Calea hispida* Baker (quercitrina (CHAM - Acetato metanólico), 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (CHCR - cristais), extrato aquoso (CHEA) e óleo essencial (CHOE)); fungicidas sintéticos (captan, ciproconazol, tebuconazol, triadimenol, mancozeb e hipoclorito de sódio); indutor de resistência (*Ascophyllum nodosum*) e um inseticida (*Bacillus thuringiensis*), a fim de se avaliar o efeito fungistático destes no desenvolvimento *in vitro* do patógeno. As avaliações foram feitas pela média de duas medidas, diametralmente opostas das colônias, diariamente, até os sete dias após a instalação do experimento. A temperatura que melhor favoreceu o desenvolvimento do patógeno *in vitro* foi a de 20°C. Já para o fotoperíodo, não houve diferença estatística entre os tratamentos testados. Observou-se que os tratamentos com os óleos essenciais de orégano e capim-limão apresentaram maior atividade antifúngica sobre o fitopatógeno, quando comparados aos demais óleos utilizados, destacando o óleo de orégano, que inibiu completamente o desenvolvimento do fitopatógeno. As substâncias isoladas de *C. hispida* apresentaram baixa porcentagem de inibição de *P. amygdali*, a qual não ultrapassou 21,88%. Os fungicidas captan, ciproconazol e tebuconazol apresentaram elevado nível de inibição em relação às outras substâncias testadas. A partir da concentração de 500 ppm, esses fungicidas atingiram 100% de controle, se mostrando os mais eficientes no controle do fungo.

Palavras-chave: *Prunus persica*, cancro do pêsego, controle alternativo, controle químico, *Fusicoccum amygdali*.

ABSTRACT

The production of peaches in Brazil has suffered production damage due to burning of branches caused by the fungus *Phomopsis amygdali*. Through experiments *in vitro* were studied, initially, the best conditions of temperature and photoperiod on the development of the pathogen. Later, under the conditions found, the fungus was subjected to different substances: plant essential oils (eucalyptus, clove, oregano, peppermint, ginger, lemongrass, citronella, rosemary and chamomile); different products extraction plant *Calea hispida* Baker (quercitrin (CHAM - Acetate methanol), 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (HCRC - crystals), aqueous extract (CHEA) and essential oil (CHOE)); synthetic fungicides (captan, cyproconazol, tebuconazole, triadimenol, mancozeb and sodium hypochlorite); an inductive resistance (*Ascophyllum nodosum*) and an insecticide (*Bacillus thuringiensis*) in order to evaluate the fungistatic effect of these *in vitro* development of the pathogen. The assessments were made by mean of two measurements, diametrically opposite the colonies daily until seven days after the onset of the experiment. The temperature better favored the development of the pathogen *in vitro* was 20°C. Have to photoperiod, there was no statistical difference between the treatments tested. It was observed that treatments with essential oils of oregano and lemon grass showed higher antifungal activity against the pathogen when compared to other oils used, highlighting the oregano oil, which completely inhibited growth of the pathogen. The compounds isolated from *C. hispida* showed low percentage of inhibition of *P. amygdali*, which did not exceed 21.88%. The fungicides captan, tebuconazole cyproconazol and showed a high level of inhibition relative to the other substances tested. From the concentration of 500 ppm, these fungicides reached 100% of control, showing the most efficient at the fungus control.

Keywords: *Prunus persica*, peach cancer, alternative control, chemical control, *Fusicoccum amygdali*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Conídios de <i>Phomopsis amygdali</i> isolados dos ramos de pessegueiro, em microscópio óptico (10X) (A) e sintomas de cancro em ramos de pessegueiro (B). Fonte: Lichtemberg (2013).	17
Figura 2 -	Ciclo de relações patógeno-hospedeiro entre <i>Phomopsis amygdali</i> e plantas de pêsego. Fonte: May de Mío (2004).	19
Figura 3 -	Aspecto da parte aérea de <i>Calea hispida</i> Baker, principal parte usada para extração dos compostos ativos. Fonte: MARTIUS et al. (1895).	25
Figura 4 -	Crescimento micelial (mm) de <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> em diferentes temperaturas. Ponta Grossa/PR, 2014.	35
Figura 5 -	Aspecto de colônias de <i>Phomopsis amygdali</i> submetidas às temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C ao final de sete dias de incubação. Ponta Grossa/PR, 2014.	36
Figura 6 -	Influência de diferentes fotoperíodos no crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> na temperatura de 20°C. Ponta Grossa/PR, 2014.	38
Figura 7 -	Aspecto da colônia de <i>Phomopsis amygdali</i> sob os regimes de luminosidade: luz contínua, 10/14h, 12/12h e escuro contínuo. Ponta Grossa/PR, 2014.	39
Figura 8 -	Picnídios de <i>Phomopsis amygdali</i> em microscópio óptico (10X) (A e B) e conídios de <i>Phomopsis amygdali</i> em microscópio óptico (40X) (C). Ponta Grossa/PR, 2014.	40
Figura 9 -	Hifas de <i>Phomopsis amygdali</i> em microscópio eletrônico de varredura (A) 500X (B) 1000X (C) 2000X e (D) 2400X. Ponta Grossa/PR, 2014.	41
Figura 10 -	Porcentagem de inibição de colônia (PIC) <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>) e orégano (<i>Origanum vulgare</i>). Ponta Grossa/PR, 2014.	42
Figura 11 -	Desenvolvimento de colônias <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>) e menta (<i>Mentha spp.</i>) (A) e camomila (<i>Chamomila recutita</i>) (B). Ponta Grossa/PR, 2014.	43
Figura 12 -	Diâmetro de colônias, <i>in vitro</i> , de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos óleos essenciais vegetais em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	43
Figura 13 -	Crescimento micelial de <i>Phomopsis amygdali</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA, contendo óleos essenciais vegetais em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	46
Figura 14 -	Porcentagem de inibição de colônia (PIC) <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos diferentes produtos de extração de <i>Calea hispida</i> em diferentes doses. Ponta Grossa/PR, 2014.	47
Figura 15 -	Diâmetro de colônias, <i>in vitro</i> , de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos produtos da extração de <i>Calea hispida</i> em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014. Legenda: CHOE – <i>Calea hispida</i> óleo essencial, CHEA – <i>Calea hispida</i> extrato aquoso, CHCR – <i>Calea hispida</i> cristais e CHAM – <i>Calea hispida</i> acetato metanólico.	48
Figura 16 -	Aspecto de colônia de <i>P. amygdali</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA, contendo os tratamentos com substâncias extraídas de <i>Calea hispida</i> em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014. Legenda: CHOE – <i>Calea hispida</i> óleo essencial, CHEA – <i>Calea hispida</i> extrato aquoso, CHCR – <i>Calea hispida</i> cristais e CHAM – <i>Calea hispida</i> acetato metanólico.	49
Figura 17 -	Porcentagem de inibição de colônias (PIC) <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos fungicidas captan, ciproconazol e tebuconazol em diferentes dosagens. Ponta Grossa/PR, 2014.	52
Figura 18 -	Porcentagem de inibição de colônias (PIC) de colônias <i>in vitro</i> de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas aos fungicidas triadimenol e mancozeb, e os produtos <i>Bacillus thuringiensis</i> e hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações.	

	Ponta Grossa/PR, 2014.	52
Figura 19 -	Diâmetro de colônias, <i>in vitro</i> , de <i>Phomopsis amygdali</i> , submetidas a fungicidas e outros produtos, em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	54
Figura 20 -	Aspecto de colônias de <i>Phomopsis amygdali</i> , <i>in vitro</i> , em meio BDA, contendo os tratamentos com fungicidas e outros produtos, em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ingredientes ativos, nomes comerciais, concentração de ingrediente ativo, grupos químicos, mecanismos de ação dos produtos empregados no controle in vitro de <i>Phomopsis amygdali</i> . Ponta Grossa/PR, 2013.	33
Tabela 2 -	Crescimento micelial (mm) de <i>Phomopsis amygdali</i> (isolado B2), em diferentes temperaturas aos 7 dias após a repicagem. Ponta Grossa/PR, 2014.	37
Tabela 3 -	Porcentagem média de inibição de colônia (PIC) (%) de <i>Phomopsis amygdali</i> em diferentes fotoperíodos. Ponta Grossa/PR, 2014.	39
Tabela 4 -	Porcentagem de inibição de colônia (PIC) dos óleos essenciais vegetais sobre <i>Phomopsis amygdali</i> em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	42
Tabela 5 -	Porcentagem de inibição de colônia (PIC) de <i>Phomopsis amygdali</i> contendo os tratamentos com <i>Calea hispida</i> Baker em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	45
Tabela 6 -	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de colônias de <i>Phomopsis amygdali</i> contendo os tratamentos com <i>Calea hispida</i> Baker em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	48
Tabela 7 -	Porcentagem de inibição de colônia (PIC) de <i>Phomopsis amygdali</i> contendo os tratamentos com produtos em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	51
Tabela 8 -	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de colônias de <i>Phomopsis amygdali</i> contendo os tratamentos com fungicidas e outros produtos em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.	51

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 A CULTURA DO PÊSSEGO	14
2.2 QUEIMA DOS RAMOS DO PESSEGUEIRO.....	16
2.2.1 Taxonomia.....	16
2.2.2 Etiologia.....	17
2.2.3 Sintomatologia.....	19
2.2.4 Danos.....	20
2.3 MEDIDAS DE CONTROLE.....	21
2.3.1 Controle químico.....	21
2.3.2. Controle alternativo.....	22
2.3.2.1 Óleos essenciais vegetais.....	23
2.3.2.2 <i>Calea</i> spp.....	24
2.3.2.3 <i>Ascophyllum nodosum</i>	26
2.4 PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS	27
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA	30
4.2 EFEITO DO FOTOPERÍODO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	31
4.3. SENSIBILIDADE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS VEGETAIS	31
4.4 SENSIBILIDADE A DIFERENTES SUBSTÂNCIAS DE <i>Calea hispida</i>	32
4.5 SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E OUTROS PRODUTOS	33
4.6 ANÁLISE DE DADOS	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA	35
5.2 EFEITO DO FOTOPERÍODO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL	38
5.3 SENSIBILIDADE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS	40
5.4 SENSIBILIDADE A DIFERENTES SUBSTÂNCIAS DE <i>Calea hispida</i>	45
5.5 SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E OUTROS PRODUTOS	50
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A cultura do pêsego tem uma participação de 1,3% no total do valor da produção de frutas no Brasil. A produção brasileira de pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch) está em 217.706 toneladas extraídas de uma área cultivada de 18.092 hectares, perfazendo uma produtividade de 12.034 kg ha⁻¹. A média de produção no período de 2001 a 2012 foi de 220.926 toneladas anuais, com área de 21.987 ha e produtividade média de 10.048 kg ha⁻¹. O Rio Grande do Sul é o principal produtor nacional, com área de 13.164 hectares e uma produção de 136.841 toneladas, ou seja, 62,85% da produção brasileira. O Rio Grande do Sul diminuiu sua área cultivada entre os anos de 2010 e 2013 de 14.933 para 13.164 ha, porém aumentou a produtividade em 5,71%. O Paraná ocupa o quinto lugar com uma produção de 11.706 toneladas obtidas de uma área de 1.284 hectares (IBGE, 2013).

A baixa produtividade do Paraná está relacionada com as propriedades que possuem baixa tecnologia, onde se observam problemas na adubação, tratos culturais e principalmente no manejo fitossanitário (FACHINELLO et al., 2009).

A ocorrência de doenças de plantas em níveis que exigem o seu controle é a consequência da prática da agricultura atual. O método mais benéfico de controle é o uso da resistência genética (LYON et al., 1995). Portanto, não são todas as plantas que são resistentes aos patógenos, e também, não é todo material resistente que é adaptado às diferentes regiões produtoras. Dessa forma, o uso de agrotóxicos no controle de doenças é cada vez mais frequente na agricultura (MOTOYAMA et al., 2003). Também, o consumidor brasileiro tem se preocupado mais com a sua segurança alimentar e de sua família e com o fato de que os produtos ofertados pra consumo nacional não tem a mesma qualidade dos que são exportados (PORTOCARRERO; KOSOSKI, 2009).

O pêsego é considerado cultura de clima temperado, até recentemente restrita à Região Sul do Brasil, expandiu-se para regiões subtropicais, como São Paulo e Sul de Minas Gerais. O clima mais quente favorece a ocorrência de doenças, e entre elas a queima dos ramos causada por *Phomopsis amygdali* (Delacroix) Tuset & Portilla (MARTINS, 2004) a qual tem exigido medidas de controle mais eficientes.

O cancro de *Fusicoccum* ou queima dos ramos é uma doença fúngica economicamente importante. Esta doença, que afeta principalmente os galhos da parte inferior das árvores, é bastante prejudicial em ambientes úmidos (MARTINS et al., 2004). Os autores ainda relatam que as amendoeiras (*Prunus dulcis* Mill) em crescimento na região do Mediterrâneo também são atacadas por *P. amygdali*.

Não existem produtos registrados para esta doença no Brasil (AGROFIT, 2014) e ainda são escassos os trabalhos referentes ao controle químico desta doença na cultura do pêssego (CARVALHO, 2002). O principal problema dos fungicidas é sua utilização de modo incorreto pelos produtores, com doses excessivas e, ainda, o processo de desenvolvimento dos produtos sintéticos é trabalhoso e oneroso devido aos vários testes em que são submetidos para chegar ao mercado (McLAREN, 1986), e ainda são um entrave na exportação de frutas.

Uma das opções de controle da doença é o controle alternativo. De acordo com Marques et al. (2004) além de serem abundantes e de baixo custo, os produtos de origem vegetal poderão constituir um método alternativo e oferecer boas perspectivas para o controle de doenças, pois, minimizam os problemas de fitotoxicidade e diminuem os resíduos tóxicos no solo, apresentados pelos produtos fitossanitários convencionais.

Fundamenta-se, assim, a hipótese: os compostos naturais biologicamente ativos, existentes em plantas medicinais e compostos presentes em outros produtos causam a inibição do desenvolvimento do patógeno *P. amygdali in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A CULTURA DO PÊSSEGO

A cultura do pêsego (*Prunus persica* (L.) Batsch) é originária da China, atingiu a Europa através da Pérsia, hoje Irã. Chegou ao Brasil com Martin Afonso de Sousa, em 1532 e difundiu-se em grande parte do Brasil (SACHS et al., 1984).

A planta de pêsego pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Prunoidea*, gênero *Prunus* (L.) e subgênero *Amygdalus*. As cultivares comerciais pertencem à espécie *Prunus persica* e apresentam três variedades botânicas distintas: *Prunus persica* var. *vulgaris*, *Prunus persica* var. *nucipersica* e *Prunus persica* var. *platycarpa*, esta última sem interesse comercial (SACHS; CAMPOS, 1998).

O Brasil ocupa a décima segunda posição no ranking mundial na produção de pêsego (238,5 mil toneladas/ano) em área de 24,2 mil hectares (FAO, 2013), com consumo *per capita* de 850 g. O consumo da fruta se concentra na Região Sul do País e ainda é considerado baixo em relação a outros países produtores. A cultura do pêsego é de alta rentabilidade, sendo uma boa opção àqueles produtores que buscam alternativas para suas propriedades (EMBRAPA, 2003).

Essa rosácea frutifica aproximadamente três anos após ser plantada, com ciclo de 15 a 25 anos. Os ramos erguem-se em ângulo agudo, com casca verde, arroxeadas quando da incidência do sol. As folhas são lanceoladas, serreadas ou crenadas, conforme a variedade, as gemas pontiagudas, um tanto peludas, duas a três em cada nó, às vezes apenas uma. As flores surgem antes das folhas, na primavera, brancas ou rosadas, podem ser usadas na ornamentação (SACHS et al., 1984). O autor ainda descreve o fruto como uma drupa subglobosa, geralmente mamilosa, perfumada, doce, aveludada, esverdeada ou amarelada, muitas vezes avermelhada do lado do sol, cujo mesocarpo ora é compacto e aderente ao caroço, ora mole e fácil de separar. A polpa, firme, doce-acidulada, ora branca, ora amarela com manchas avermelhadas perto do caroço. Os frutos podem apresentar polpa branca ou amarela e destinarem-se para consumo *in natura*, para indústria de conserva ou para ambas as finalidades (RASEIRA; NAKASU, 2002; BARBOSA et al., 1990).

Uma cultivar amplamente cultivada no Sul do Brasil é a Chimarrita, devido a altas produtividades alcançadas e baixa necessidade de frio hibernal (BIASI et al., 2004).

Hoffmann et al. (2003) descrevem a planta de pêsego como de médio vigor, de forma aberta e muito produtiva, produzindo em média 50 kg por planta. Necessita de no mínimo 200 horas de acúmulo de frio para produzir bem, ou seja, vai de baixa a alta necessidade de frio hibernal de acordo com a cultivar. Em função da cultivar e da região, a planta floresce de junho a setembro, quando as ondas de frio são mais frequentes. As partes da flor mais sensíveis às baixas temperaturas são o pistilo e as anteras. Em geral, a flor, na fase de botão rosa, pode resistir até $-3,9^{\circ}\text{C}$; quando aberta, até $-2,5^{\circ}\text{C}$; e o fruto recém-formado, até $-1,6^{\circ}\text{C}$ (EMBRAPA, 2005). Por ser suscetível às doenças foliares após a colheita, a planta necessita de adequado manejo fitossanitário para evitar a queda prematura de folhas antes do período de dormência.

Para o plantio, utilizam-se mudas enxertadas sobre cavalos de plantas de pêsego, propagadas por sementes, de preferência da cultivar Okinawa, resistente aos nematóides de galhas (*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood). Para mudas de raízes nuas, o plantio é feito de julho a agosto e para plantio em recipientes, é feito em qualquer época do ano, de preferência na estação das águas (OJIMA et al., 1998).

Barbosa et al. (1990) comentam que a planta de pêsego possui um extenso período juvenil, esse período pode chegar a três anos, dependendo do seu genótipo e das condições ambientais. Dependendo de suas características de maturação, podem apresentar ciclos de desenvolvimento dos frutos bastante diferenciados (TUKEY, 1933, 1955, LILLIEN-KIPNIS; EREZ; LAVEE, 1971). Os ciclos podem ser designados como precoces, medianos e tardios, com ciclos da florada à maturação estimados em 70-120, 121-160 e 161-200 dias, respectivamente. Na persicultura em São Paulo, há cultivares, desde bem precoces até bem tardias de florada à maturação dos frutos variando na faixa de 80 a 200 dias (BARBOSA et al., 1990).

O tempo de floração na cultura do pêsego é influenciado por dois fatores: a necessidade de acúmulo de frio para superação da endodormência e o requerimento de calor na ecodormência. Uma vez satisfeita à necessidade de frio e calor as plantas florescem (CITADIN et al., 2001). A endodormência é uma divisão da dormência de plantas de clima temperado estimulada pelo encurtamento do fotoperíodo e a queda das temperaturas. As gemas perdem clorofila e tornam-se castanho claro a escuro, devido ao acúmulo de lignina e outros compostos fenólicos nas paredes celulares caracterizando o início da endodormência. Ao se acumular o mínimo de horas de frio, exigida para cada cultivar, efetivamente iniciará a

transição desta fase para a ecodormência (PINTO et al., 2012). Na ecodormência, portanto, as gemas possuem completa capacidade de brotar, porém, permanecem em repouso até que a temperatura torne-se mais elevada, na primavera, permitindo que estabeleça a fase vegetativa da planta (LANG et al., 1987).

Scariotto (2011) cita trabalho de Szabó; Nyéki e Szalay (2000) que comentam que as frutíferas de caroço, dentre elas o pêssigo, geralmente apresentam altas taxas de frutificação efetiva, podendo variar de 13,5 a 83,2%, desde que a floração coincida com dias ensolarados e secos e temperaturas baixas. A partir da temperatura de 4,5°C é estimulada a abertura das gemas florais no pêssigo (RICHARDSON, 1975; NAVA, 2007).

2.2 A QUEIMA DOS RAMOS DO PÊSSEGO

A queima dos ramos ou cancro de *Fusicoccum* do pêssigo é causada pelo fungo *Phomopsis amygdali* (Delacroix) Tuset & Portilla. O gênero *Phomopsis* inclui espécies fitopatogênicas a um grande número de hospedeiros lenhosos e herbáceos. São encontrados em sua maioria no estado anamórfico e suas espécies podem causar graves prejuízos ao infectar plantas cultivadas, como em árvores frutíferas, provocando cancos, podridões e necroses, entre outras patologias. Estes fungos ainda podem viver como endófitos, sem causar qualquer dano à planta hospedeira, podendo tornar-se patogênico quando o hospedeiro se encontra senescente ou sob condições de stress. Determinadas espécies apresentam ainda comportamento saprofítico (SANTOS, 2008).

2.2.1 Taxonomia

O nome e identificação do patógeno *P. amygdali* foram colocados em questão em estudos anteriores, com *Fusicoccum* e *Phoma* como gêneros sugeridos. No entanto, um estudo taxonômico relativamente recente redesignou o agente causal da queima dos ramos de *Fusicoccum amygdali* para *Phomopsis amygdali* (TUSET; PORTILLA, 1989; LALANCETTE; POLK, 2000). O gênero *Phomopsis* tem sido relatado como agente causal de doenças de pêssigos em muitos países (THOMIDIS; MICHAILIDES, 2009), apresentando a seguinte classificação:

Phomopsis amygdali (Del.) Tuset & Portilla (1989)

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Classe: *Sordariomycetes*

Ordem: *Diaporthales*

Família: *Diaporthaceae*

Gênero: *Phomopsis*

Espécie: *Amygdali*

2.2.2 Etiologia

Phomopsis amygdali forma picnídios nos tecidos infectados que são usualmente solitários, eustromáticos, globosos ou aplanados, algumas vezes elipsoidais, castanho-escuros ou negros, com 180-550 μm de diâmetro e ostiolados. Os picnídios libertam os conídios através de cirros, que são disseminados pela chuva. Os conidióforos são hialinos, cilíndricos, espaçadamente ramificados e com um a dois septos na base. Os conídios do tipo alfa são unicelulares, hialinos, fusiformes com as extremidades ligeiramente pontiagudas, com 4,9-9,9 x 2,3-3,8 μm (Figura 1A). Os beta conídios são mais raros, muitas vezes não observados (UDDIN et al., 1997), unicelulares, filiformes, hialinos, com a extremidade ligeiramente curva, com 14,5-23,1 x 1,1-1,9 μm (ZEHR, 1995).

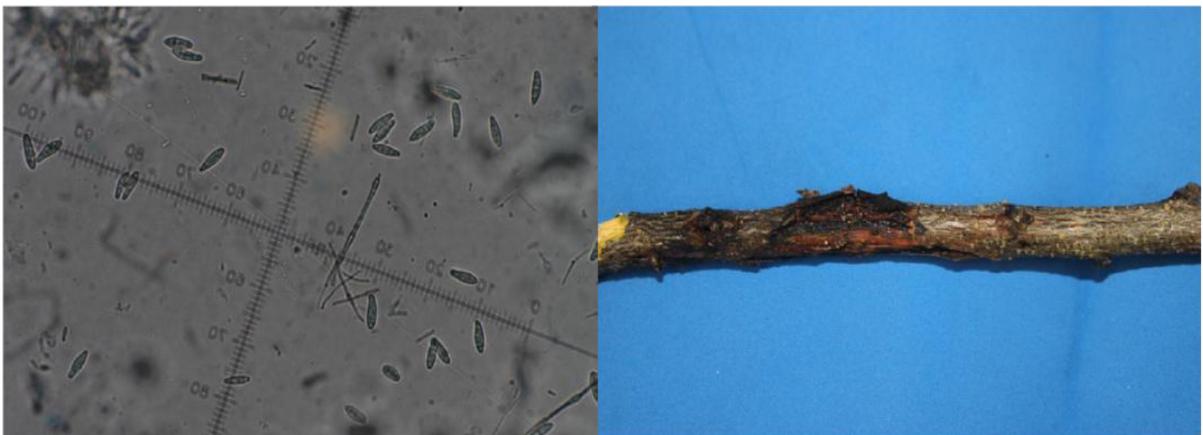


Figura 1 - Conídios de *Phomopsis amygdali* isolados dos ramos de pessegueiro, em microscópio óptico (10X) (A) e sintomas de cancro em ramos de pessegueiro (B). Fonte: Lichtemberg (2013).

Um ciclo de doença por estação é típico, mas no mínimo um segundo ciclo secundário pode ocorrer se as condições favorecerem a infecção (Figura 2). Os esporos produzidos em picnídios nos tecidos infectados são liberados pela chuva. Os conídios germinam em superfícies úmidas em 5 a 36°C, com ótimo de 27 a 29°C (ROMERO; VARGAS, 1981; MARTINS et al., 2002).

A temperatura ótima para a formação de cirros é de 19 a 20°C na esporulação de *P. amygdali* em ramos de pêssigo, enquanto a temperatura ótima para a máxima produção de conídios por picnídio é de 22 a 23°C, no final de 72h com umidade relativa superior a 95%. No intervalo de temperatura ótimo, a esporulação ocorre no período de 16 a 48h após a exposição à umidade de 95% (LALANCETTE et al., 2003). Uddin e Reynolds (1997) ao estudarem a produção e dispersão de conídios, concluíram que estas são favorecidas por elevadas precipitações e temperaturas moderadas.

Segundo Lalancette et al. (2003), umidade relativa superior a 90% atrasa a produção de goma e suberina e a formação de periderme nas cicatrizes recém formadas, sendo assim um fator determinante para a epidemiologia da doença, pois prolonga a suscetibilidade da planta em relação aos patógenos.

As infecções ocorrem no outono através dos ferimentos ocasionados pela queda das folhas ou no início da primavera através de gemas, cicatrizes de gemas, espículas, frutos, ou flores ou ainda diretamente através de brotações novas. Infecções de verão podem ocorrer se injúrias mecânicas coincidirem com o tempo úmido. O desenvolvimento de lesões e velocidade de infecção é interrompido por temperaturas frias no inverno (LALANCETTE; POLK, 2000; ZEHR, 1995). Contudo Uddin et al. (1997) confirmaram que a infecção pode ocorrer sem existência de ferimentos através dos gomos dormentes.

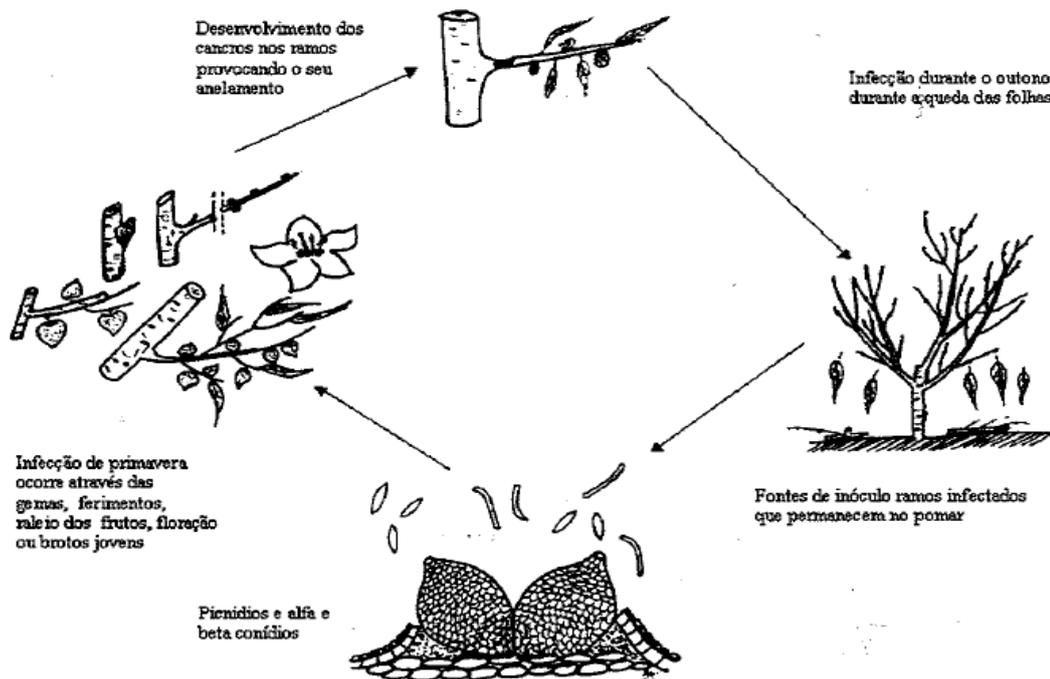


Figura 2 - Ciclo de relações patógeno-hospedeiro entre *Phomopsis amygdali* e plantas de pêssego. Fonte: May de Mio (2004).

A ocorrência do cancro do pessegueiro se dá nos meses de novembro e dezembro. É facilmente notado pelo sintoma característico de lesões (cancros) alongadas de coloração marrom a marrom-avermelhadas que são formadas em gema infectada ou nó do ano (GARRIDO; SÔNEGO, 2003) (Figura 1B). Os autores ainda descrevem que as primeiras lesões tornam-se visíveis inicialmente na primavera, e com o desenvolvimento, causam o anelamento e a seca do ramo. O aumento no número de ramos secos pode continuar até o verão. O período de incubação é de aproximadamente um mês (LALANCETTE et al., 2003).

2.2.3 Sintomatologia

Em pessegueiros e amendoeirais, *P. amygdali* provoca sintomas como: lesões ligeiramente deprimidas (cancros) nos ramos de um ano de idade (ZEHR, 1995), “shoot blight”, podridão e em casos graves, a perda dos galhos e conseqüente morte da árvore (CARLIER et al., 2011). Lalancette e Polk (2000) afirmam que a infecção causada pelo fungo é caracterizada por necrose marrom, comumente apresentando goma ou resina, envolvendo galhos e brotos jovens, às vezes com estrangulamentos na base e manchas foliares redondas com necrose marginal. A região necrosada tem uma forma elíptica (SIMÕES, 2008).

O fungo secreta uma toxina que estimula as células guardas dos estômatos a permanecerem abertas, acelerando a seca dos ramos acima do local infectado. Esta toxina é a fusicoccina que provoca alteração no gradiente eletroquímico das células, pois ela converte a energia dos radicais fosfatados em gradiente eletroquímico de prótons ao nível da membrana. A bomba de prótons induz à absorção de K^+ provocando a alcalinização do meio, o alongamento celular e a perda de resistência da parede, provocando o aumento celular, efluxo de prótons, acréscimo do fluxo de potássio para o interior da célula, levando à abertura estomática permanente por desequilíbrio osmótico (STROBEL, 1982).

A fusicoccina é altamente ativa, toxicológica e fitopatológica. Soluções com concentrações de 0,1 a 0,2 ppm de fusicoccina causaram necrose e murcha em testes realizados em laboratório (GRANITI, 1964; VERDU 1986).

No local da infecção comumente aparece uma goma, mas não pode ser um fator para diagnóstico da doença, visto que outras doenças também podem formar esse exsudado, como as causadas por *Monilinia* spp. (MARTINS; OLIVEIRA, 2004).

O desenvolvimento da queima dos ramos é favorecido principalmente por níveis elevados de azoto no solo e pelo clima úmido, uma vez que esta doença é disseminada apenas pela chuva. A disseminação desta doença é muito lenta, mas uma vez contaminada, se faz necessária a erradicação do pomar, o que é um processo difícil e oneroso (ROMERO; VARGAS, 1981; MARTINS et al., 2002).

2.2.4 Danos

Plantas de pêsego e amêndoas são mais suscetíveis a *P. amygdali*, resultando em grandes danos a produção (LALANCETTE, 2000; MARTINS et al., 2002). É um patógeno de importância econômica em amêndoas e pêsego e tem sido relatado em vários países como Estados Unidos (ADASKAVEG et al., 1999; UDDIN et al., 1997), China (DAI et al., 2012), Portugal (DIOGO et al., 2010) e Grécia (MICHAILIDES, 2006).

Espécies de *Phomopsis* são consideradas patógenos secundários ou oportunistas, pois afetam plantas que estão morrendo e/ou infectadas por outros patógenos. Porém existem vários relatos desse patógeno afetando gravemente uma grande variedade de plantas como cana-de-açúcar, soja, girassol, álamo, algumas coníferas, entre outras (BIENAPFL; BALCI, 2013).

Foi relatado surto de queima dos ramos na cultivar de pêssegos Gold Jubilee entre 1949 e 1950 em Maryland (EUA), onde as árvores foram arrancadas dos pomares. Milhares de plantas de pêssego também foram erradicados de pomares de New Jersey entre as décadas de 1940 e 1950. Não se quantificaram os danos, mas as observações de campo estão estimadas em 21-28,5% (LALANCETTE; POLK, 2000).

Thomidis et al. (2009) relatam que o fungo *P. amygdali* causou danos de até 5% na produção de pêssegos na Grécia, sendo responsável por perdas econômicas.

Phomopsis amygdali é considerado um das mais agressivas espécies de *Phomopsis* devido à sua capacidade de causar altos níveis de doença (UDAYANGA et al., 2011; BIENAPFL; BALCI, 2013).

2.3 MEDIDAS DE CONTROLE

2.3.1 Controle químico

O controle químico é o método mais eficaz para controlar doenças em árvores frutíferas. Conhecer as condições ambientais como temperaturas ideais para o desenvolvimento do patógeno é essencial para determinar o melhor método e tempo para aplicar fungicidas contra *P. amygdali* no campo (THOMIDIS; MICHAILIDES, 2009).

O controle de *P. amygdali* apresenta dificuldades se o emprego de fungicidas não for executado no tempo e com frequência adequados (VERDU, 1986).

Estudando a ação de fungicidas durante abscisão no outono em plantas de pêssego, Lalancette e Robison (2002) relataram que quatro a cinco aplicações dos fungicidas captan, clorotalonil, azoxistrobin e miclobutanil reduziram a incidência de cancro causada por *P. amygdali* em 69%, 71%, 41% e 44%, respectivamente. Estudos anteriores realizados na Grécia demonstraram resistência aos benzimidazóis em isolados de campo de *Phomopsis spp* (THOMIDIS; MICHAILIDES, 2009b).

Garrido e Sônego (2003) afirmam que a aplicação de alguns fungicidas antes da infecção é eficiente. O manejo adequado na poda e destruição dos ramos também é fundamental, pois elimina os restos culturais e conseqüentemente a fonte de inóculo para o ano subsequente no pomar. É recomendada a aplicação de fungicidas a base de tebuconazole,

captan ou mancozeb, para proteção dos ferimentos após a poda. O controle químico após o aparecimento dos sintomas não é eficiente.

Thomidis et al. (2009) concluíram que os fungicidas iprodione, carbendazim, tiofanato-metil e tebuconazol inibiram o crescimento de *P. amygdali in vitro*. Os fungicidas cúpricos e à base de enxofre também se mostraram eficientes no controle do patógeno *in vivo* (VERDU, 1986).

Apesar do uso de agrotóxicos em curto prazo provocarem um efeito positivo para o produtor, o uso em longo prazo resulta numa desvantagem para o meio ambiente e a sociedade, além do surgimento de organismos resistentes às substâncias químicas utilizadas (STANGARLIN et al., 1999).

2.3.2 Controle alternativo

O uso irracional de agrotóxicos tem provocado o acúmulo de compostos nocivos no meio ambiente, levando ao surgimento de populações de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas além do desequilíbrio ambiental, pela falta de seletividade dos produtos utilizados. Os produtores orgânicos possuem poucas alternativas no que diz respeito ao controle fitossanitário, uma vez que a grande maioria dos produtos disponíveis no mercado não pode ser utilizada na agricultura orgânica. Aliado a esses fatos, atualmente com os efeitos negativos para o homem e o meio ambiente e o crescimento da exigência dos consumidores por alimentos livres de pesticidas, várias pesquisas estão sendo realizadas voltadas para a busca de produtos fitossanitários naturais como formas alternativas de controle de doenças de plantas (SOUZA JÚNIOR et al., 2009).

Desde o começo dos tempos os produtos naturais são utilizados pela humanidade como importantes ferramentas nos procedimentos das terapias naturais (MACHADO, 2011). O controle alternativo de doenças pode ser realizado por meio do controle biológico, da indução de resistência em plantas e do uso de produtos alternativos ao controle químico, como óleos essenciais e extratos vegetais (STANGARLIN et al., 1999).

O controle biológico e a indução de resistência fazem parte do conceito de agricultura alternativa ou sustentável, excluindo-se assim o controle químico e o melhoramento genético (BETTIOL, 1991).

Novas medidas de proteção contra doenças de plantas estão sendo buscadas com o objetivo de produzir alimentos de melhor qualidade e minimizar os efeitos negativos do uso de agrotóxicos (ZANANDREA et al., 2004).

2.3.2.1 Óleos essenciais vegetais

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor. São sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e normalmente extraídos de plantas encontradas em países tropicais, como os países do mediterrâneo e dos trópicos (MACHADO, 2011). Possuem diferentes propriedades biológicas como ação larvicida (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010) e fungicida (CARMO et al., 2008). Devido à diversidade de propriedades apresentadas pelos óleos essenciais, há um crescente número de estudos, visando confirmar a atividade antimicrobiana dos constituintes dos óleos (MELO et al., 2006). Cerca de 60% dos óleos essenciais já testados possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (CARREIRA, 2007).

Nos vegetais, os óleos exercem funções na defesa contra o ataque de fitopatógenos, animais herbívoros e também pode agir na atração de organismos benéficos (PERES, 2004)

O entendimento da complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais só foram possíveis com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, o qual consiste normalmente de monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis (MACHADO, 2011). O efeito da atividade biológica exercida pelo óleo essencial pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes naquele óleo, ou seja, pela análise dos constituintes químicos não é possível afirmar que o componente presente em maior quantidade é o que realiza a atividade biológica em estudo (MUKHERJEE et al. 2007; VAN ZYL et al. 2006).

Rozwalka (2003) demonstrou que ocorreu inibição total ou parcial do crescimento micelial de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, observada *in vitro*, por óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais como o cravo, que inibiu totalmente o crescimento micelial de *G. cingulata*. O óleo essencial de capim-limão inibiu em 100% até o quinto dia, apresentou redução no potencial de inibição para 62,77% no oitavo dia. O mesmo

fato ocorreu com os óleos essenciais de alfavaca com redução de 52,02% aos 3 dias para 24,7% aos 8 dias e funcho de 84,8% para 20,88%. A autora concluiu que estes resultados indicam a existência de compostos com ação fungitóxica que possibilitaram o emprego destes no controle alternativo destes patógenos.

Os óleos essenciais vegetais são considerados fontes para o desenvolvimento de novos produtos naturais. Entretanto, sabe-se que grande parte da flora brasileira ainda não foi estudada, sendo a descoberta de novos compostos químicos, a partir de plantas, capazes de controlar o desenvolvimento de fitopatógenos de grande importância (STANGARLIN et al., 1999).

2.3.2.2 *Calea* spp.

As plantas do gênero *Calea* são angiospermas pertencentes à família *Asteraceae* que abrange cerca de 1.535 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER, 1996). A família ainda é dividida em três subfamílias: *Barnadesioideae*, *Cichorioideae* e *Asteroideae*, com distribuições bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO et al., 1991; JOLY, 1991).

As características morfológicas relevantes do gênero *Calea* são: hábito arbustivo; folhas simples, geralmente opostas, menos comumente alternadas ou opostas, corolas glabras ou glandulares, amarelas, menos frequentemente brancas ou avermelhadas, anteras amarelas, aquênios geralmente pretos, não estriados, prismáticos à um pouco achatados (Figura 3) (PRUSKI, 1982).

A planta ocorre em diversos países das Américas, inclusive no Brasil. Várias espécies desse gênero são estudadas devido às propriedades dos seus compostos ativos: antiinflamatórios, vasodilatadores anti-hipertensivos, antileishmania, antioxidantes, acaricidas, antifúngicos, antimicrobianos, citotóxicos, entre outros (GÓMEZ et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2004).

Os óleos essenciais das várias espécies de *Calea* estudadas apresentam terpenóides com atividades biológicas moderadas e compostos fenólicos, os quais são os principais responsáveis pelas atividades biológicas reportadas para as substâncias voláteis (NAME, 2013).

O óleo essencial extraído das folhas de *Calea clematidea* apresentou atividade antifúngica moderada no controle de alguns fungos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (FLACH et al., 2002).

Siebertz (1990) relataram que comumente são encontrados os compostos denominados cromenos em plantas da família *Asteraceae*, principalmente aquelas pertencentes às famílias *Astereae*, *Eupatorieae*, *Heliantheae*, *Inuleae* e *Senecioneae*. Os cromenos são metabólitos secundários caracterizados pela presença de um núcleo benzopirânico composto de um anel benzeno fundido a um anel pirano (SOUZA JÚNIOR, 2014). A análise dos extratos de parte aérea (folhas) de *Calea hispida* Baker identificou o cromeno 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (NAME, 2013).



Figura 3 - Aspecto da parte aérea de *Calea hispida* Baker, principal parte usada para extração dos compostos ativos. Fonte: MARTIUS et al. (1895).

Ribeiro et al. (2011) também identificaram a composição química de *Calea serrata* Less e encontraram o cromeno precoceno II como principal constituinte.

O precoceno, encontrado na planta *C. hispida*, também está presente em outras plantas como o mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.). A constituição química do óleo é formada por

38 compostos com uma elevada concentração, perfazendo um total de 34,4% (MARTINS et al., 2005). Ao ser estudado, o óleo essencial de mentrasto revelou atividade fungitóxica sobre os fitopatógenos *Rizoctonia solani* e *Bipolares sorokoniana* nas concentrações de 0,09 e 0,10 mg mL⁻¹, respectivamente (VIEIRA et al., 2012). Esta substância também apresenta atividade inseticida (PROKSCH; RODRIGUEZ, 1983).

Similar a estes estudos, os extratos de folhas e flores de *Calea platylepis* mostraram atividade antimicrobiana contra *Trypanosoma cruzi* e *Candida* spp. (NASCIMENTO et al., 2004).

2.3.2.3 *Ascophyllum nodosum*

A utilização do extrato de algas é crescente na agricultura por ser uma fonte ecologicamente correta de indução de resistência, fertilizante, bioestimulante e, ainda, como protetor de plantas contra doenças como a antracnose, melhorando o desempenho dos cultivos (PUNJA, 2011; KUMAR; SAHOO, 2011). A alga marinha *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis destaca-se dentre espécies comumente empregadas para tais finalidades (UGARTE; SHARP; MOORE, 2006). A alga é popularmente conhecida como alga marrom por possuir tal coloração e é encontrada nas costas rochosas do oceano Atlântico no Canadá, mares árticos e no Norte da Europa (COLAPIETRA; ALEXANDER 2006; RAYORATH et al., 2009), onde a temperatura da água não excede 27°C (KESER et al., 2005).

De acordo com o rótulo do produto comercial Acadian® Marine Plant Extract o extrato da alga *A. nodosum* possui aparência de líquido viscoso de cor marrom-escuro, odor marinho, 100% de solubilidade em água, pH levemente alcalino, alto teor de matéria orgânica e outros compostos como nutrientes e aminoácidos.

O extrato da alga *A. nodosum* tem como mecanismo de ação o estímulo da atividade de síntese da fitoalexina, capsidiol e peroxidases em plantas, aumentando assim, a resistência das plantas às doenças (ABREU et al., 2008). Mógor (2008) cita que o extrato da alga *A. nodosum* é rica em citocininas, classe de hormônios vegetais que promovem a divisão celular, assim é possível retardar a senescência de tecidos vegetais pela ação da alga. Pelos benefícios proporcionados, os estudos agrônômicos com algas marinhas vêm sendo ampliados com a finalidade de esclarecer seus mecanismos de ação na indução de resistência de plantas (BIOCAMPO, 2014).

Plantas de pepino tratadas com extrato de *A. nodosum* apresentaram menor incidência das doenças causadas por *Didymella applanata* (Niessl) Sacc., *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Botrytis cinerea* Pers., e exibiram acréscimo da atividade enzimática relacionada á defesa vegetal (JAYARAMAN; NORRIE; PUNJA, 2011).

Allègre et al. (2009) atribuiu à alga marrom a habilidade de promover o fechamento dos estômatos após a sinalização da infecção por míldios. Isto se dá por meio dos oligossacarídeos, presentes nos extratos de algas marrons. O efeito está correlacionado com o tamanho das moléculas dos oligossacarídeos e que o tratamento alternativo não é eficiente exclusivamente por manter os estômatos fechados por mais tempo e impedir a entrada de *Plasmopara viticola* no tecido da videira, sendo necessário à sinergia de efeitos benéficos do extrato de alga, como síntese de fitoalexinas, para se obter a eficiência no controle.

Em *Arabidopsis thaliana*, diferentes tipos de extratos desta alga em água, clorofórmico e acetato-etílico, induziram a resistência sistêmica dependente do ácido jasmônico, composto envolvido na resistência basal das plantas contra *Pseudomonas syringae* e *Sclerotinia sclerotiorum* (SUBRAMANIAN et al., 2011).

2.4 PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS

A produção mundial de frutas tem obtido um crescimento notável. A produção teve um incremento anual de cerca de 3% nas duas últimas décadas. Em 2011, quase 640 milhões de toneladas de frutas foram colhidas em todo o mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com 38,8 milhões de toneladas produzidas (6,4% da produção mundial) (FAO, 2013).

O consumidor brasileiro busca cada vez mais produtos que tem origem certificada, ou seja, alimentos seguros e preocupa-se também que a qualidade dos produtos exportados não é a mesma dos comercializados nacionalmente (PORTOCARRERO, 2009; GOMES et al., 2003). A exigência de mercados estrangeiros consumidores de frutas se mostra cada vez maior, principalmente o Europeu. Com isso, foi necessária a implementação da certificação de qualidade em frutas para exportação por meio do SAPI (Sistema Agropecuário de Produção Integrada), lançando o PIF (Produção Integrada de Frutas) em 2001, que garantiu uma certificação oficial e cumpriu os requisitos preestabelecidos (FACHINELLO et al., 2009).

Titi et al. (1995) definem a produção integrada como “Um sistema de exploração agrária que produz alimentos e outros produtos de alta qualidade mediante o uso de recursos naturais e de mecanismos reguladores para minimizar o uso de insumos e contaminantes pela integração de práticas de manejo das plantas frutíferas, assegurando uma produção agrícola mais sustentável”.

A produção integrada de pêssegos (PIP) iniciou-se no Rio Grande do Sul, maior produtor nacional e em 2002 foi implantada no Paraná (FACHINELLO, et al., 2009).

A produção integrada quando comparada à produção convencional, demonstra superioridade. Fachinello et al. (2004) comprovaram que a produção integrada da cultivar de pêssego Diamante foi 66% maior quando comparado à convencional, na região de Pelotas (RS), não apresentando danos na quantidade e qualidade de frutas.

3 OBJETIVOS

Nesse contexto, objetivou-se:

- Verificar os efeitos de temperaturas e fotoperíodos, sobre o desenvolvimento micelial de *Phomopsis amygdali*;
- Verificar os efeitos de produtos naturais e sintéticos sobre o desenvolvimento micelial de *Phomopsis amygdali*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, nos anos de 2012 e 2013.

Primeiramente foram conduzidos os experimentos de temperaturas e fotoperíodos. Após se determinar as condições ideais, foram realizados os experimentos com fungicidas, óleos essenciais e diferentes produtos extraídos de *Calea hispida* sob as condições de temperatura e fotoperíodo encontradas.

O isolado de *Phomopsis amygdali* adotado como padrão foi o isolado B2, cedido pelo Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID) da UFPR - Universidade Federal do Paraná e foi multiplicado em BDA (batata-dextrose-ágar) e conservado em câmara BOD a 22°C para utilização nos testes. Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento, sendo cada placa de Petri com as colônias do patógeno considerada uma repetição. Os trabalhos de incubação foram conduzidos em câmara incubadora tipo BOD.

Em todos os experimentos, discos de 7 mm de diâmetro contendo micélio do isolado do patógeno, com 15 dias de idade e mantido em temperatura controlada; foram repicados em condições assépticas para placas de Petri (90 mm) com o meio de cultura BDA contendo os tratamentos. Para determinar o efeito dos tratamentos nos diferentes experimentos foi avaliado o crescimento micelial das colônias mensuradas diariamente a partir de medidas diametralmente opostas, com auxílio de régua.

4.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

Para determinar o efeito da temperatura no crescimento micelial de *P. amygdali*, placas de Petri contendo discos do patógeno no meio de cultura BDA foram submetidas às seguintes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C. As placas com as colônias foram incubadas em câmara incubadora tipo BOD, no escuro contínuo e o diâmetro da colônia foi avaliado a cada 24 horas até 50% das colônias fúngicas atingirem os bordos das placas de Petri, nas diferentes temperaturas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 EFEITO DO FOTOPERÍODO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

Para a avaliação do fotoperíodo foram testadas diferentes combinações de exposição à luz e ao escuro, totalizando 24 horas. Utilizou-se iluminação artificial, fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes (Philips TL-D 15W/75-650), distantes 10 cm das placas de Petri contendo as colônias.

No experimento, quatro combinações de luz/escuro foram avaliadas: luz contínua; 10h de luz/14h de escuro; 12h de luz/12h de escuro e escuro contínuo. Os discos de micélio de *P. amygdali* foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e os mesmos submetidos à temperatura ideal de crescimento encontrada anteriormente. O diâmetro da colônia foi avaliado a cada 24 horas até a 50% das colônias fúngicas atingirem os bordos das placas de Petri, nos diferentes fotoperíodos. A testemunha (dose 0%) para todos os testes posteriores foi determinada pelas condições que favoreceram o crescimento sob temperatura e fotoperíodo determinados nos testes descritos nos itens 4.1 e 4.2.

Para os testes de determinação de fotoperíodos, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, sendo realizada a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 SENSIBILIDADE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS VEGETAIS

Foram testados 9 óleos essenciais vegetais comerciais da marca Quinari®: eucalipto (*Eucalyptus spp.*), cravo (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*), menta (*Mentha spp.*), gengibre (*Zingiber officinale*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e camomila (*Chamomila recutita*) nas concentrações 1, 5, 10 e 20% e a testemunha somente com o meio de cultura BDA, para avaliar a sensibilidade *in vitro* de *P. amygdali*.

Foi preparada solução estoque com a mistura óleo essencial + tween 20 + água destilada esterilizada na concentração de 20% para cada um dos óleos essenciais. Estes foram

diluídos em série até a obtenção das concentrações a serem testadas com auxílio de micropipeta graduada. Foi distribuída uma alíquota de 20 µl por placa contendo o meio BDA, distribuídos em quatro pontos equidistantes de 5 µl cada e em seguida transferidos os discos de micélio da colônia de *P. amygdali*, para o centro das placas. As placas foram incubadas até mais de 50% da testemunha encontrar os bordos da placa e foi avaliado o crescimento micelial (mm), a porcentagem de inibição de colônia (PIC) e o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, arranjado no esquema fatorial 9 (óleos essenciais) x 5 (concentrações: 0, 1, 5, 10 e 20%), com cinco repetições, sendo cada placa considerada uma repetição.

4.4 SENSIBILIDADE A SUBSTÂNCIAS DE *CALEA HISPIDA*

Foram testadas as substâncias isoladas de *Calea hispida*, quercitrina (CHAM – acetato metanólico), 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (CHCR – cristais), extrato aquoso de *Calea hispida* (CHEA) e óleo essencial de *Calea hispida* (CHOE), obtidos por diferentes modos de extração da planta conforme descrito por Name (2013). Os produtos foram extraídos e cedidos pelo departamento de química da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Foi preparada uma solução estoque para cada produto utilizando-se solventes na sua diluição. Para o extrato aquoso (CHEA), foi utilizada água como solvente e para o restante das substâncias (CHAM, CHCR e CHOE) foi utilizado éter etílico para a diluição. As concentrações utilizadas foram: 1, 3, 5, 7 e 10%, mais uma testemunha com água destilada esterilizada e outra com éter etílico.

Foram distribuídas alíquotas de 20 µl por placa, distribuídos em quatro pontos equidistantes de 5 µl cada. Os discos de micélio do patógeno foram depositados em seguida no centro das placas contendo o meio BDA com as substâncias e a testemunha somente com o meio BDA. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, arranjado no esquema fatorial 4 (substâncias – CHEA, CHAM, CHCR e CHOE) x 6 (concentrações – 0, 1, 3, 5, 7 e 10%), com cinco repetições, sendo cada placa considerada uma repetição. Foi avaliado o crescimento micelial das colônias mensuradas a partir de medidas diametralmente opostas, com auxílio de régua diariamente até a mais de 50% da testemunha atingir os bordos da placa.

4.5 SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E OUTROS PRODUTOS

Neste experimento foi avaliado o crescimento micelial de *P. amygdali* submetido a fungicidas, indutor de resistência (Acadian®) e o produto Dipel®, comumente utilizado como bioinseticida, adicionados ao meio de cultura BDA, com cinco repetições (Tabela 1). A testemunha foi composta apenas com meio BDA.

Para todos os produtos testados, as doses foram: 0, 1, 10, 100, 500 e 1000 ppm de ingrediente ativo em meio de cultura BDA. Foi preparada solução estoque em água esterilizada para cada um dos produtos e em seguida estes foram diluídos em série para obtenção das concentrações e adicionados ao meio de cultura, após a autoclavagem, antes da solidificação pela ação do ágar, com auxílio de uma micropipeta graduada. Os discos de micélio do patógeno foram colocados em condições assépticas nas placas de Petri contendo o meio de cultura adicionado dos tratamentos. As placas foram incubadas nas condições de temperatura e fotoperíodo determinadas nos itens 4.1 e 4.2 e mensurados os diâmetros das colônias com auxílio de régua. Também se observou a coloração do verso e reverso das colônias e o aspecto do micélio aéreo.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, arranjado no esquema fatorial 8 (ingredientes ativos) x 6 (concentrações), com cinco repetições.

Tabela 1 – Ingredientes ativos, nomes comerciais, concentração de ingrediente ativo, grupos químicos, mecanismos de ação dos produtos empregados no controle *in vitro* de *Phomopsis amygdali*. Ponta Grossa/PR, 2013.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Conc. i.a. ¹	Grupo químico	Mecanismo de ação
Captan	Captan SC	480 g L ⁻¹	Dicarboximida	Inativação de enzimas
ciproconazol	Alto 100	100 g L ⁻¹	Triazol	Bloqueio na biossíntese de Ergosterol
tebuconazol	Folicur 200 EC	200 g L ⁻¹	Triazol	
triadimenol	Bayfidan EC	250 g L ⁻¹	Triazol	
mancozeb	Dithane NT	800 g Kg ⁻¹	Ditiocarbamatos	Inativação de enzimas
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dipel WP	32 g Kg ⁻¹	Inseticida biológico	Solubilização de proteínas Cry
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Acadian	ND ²	Indutor de resistência	Síntese da fitoalexinas e peroxidases
Hipoclorito de sódio	Q'boa	1-2%	Cloro	Dissolução de tecidos

¹Concentração do ingrediente ativo em gramas por litro ou quilograma; ² Não Determinado, foi considerado como produto puro, apenas extrato de algas.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Com os valores de crescimento micelial obtidos nos testes com fungicidas e outros produtos, óleos essenciais e *Calea hispida*, a avaliação do efeito fungitóxico *in vitro* foi determinado através da porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) comparando-se o diâmetro das colônias (mm) dos tratamentos com a testemunha após 7 dias de incubação (EDGINGTON et al., 1971), pela equação descrita abaixo:

$$PIC = \frac{(\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento})}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

As medições diárias foram utilizadas no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991), onde IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, D= diâmetro médio atual da colônia, Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior, N = número de dias após a inoculação.

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

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para as porcentagens de inibição de colônia (PIC) o efeito das doses de cada tratamento foi comparado por análise de regressão, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT 7.7 versão beta (2008).

Para análise, os dados de porcentagem foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{(x + 1)}/100$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

Os resultados do crescimento micelial da linhagem de *Phomopsis amygdali* analisada, após 7 dias de incubação, em função de diferentes condições de temperatura, estão demonstrados na Figura 4.

Sete dias após a repicagem, a colônia de *P. amygdali* em mais 50% das repetições atingiu os bordos da placa de Petri de 90 mm.

As colônias que obtiveram os maiores valores para crescimento micelial, foram observadas na temperatura de 20, 25 e 30°C, diferindo estatisticamente dos demais. As temperaturas de 20, 25 e 30°C favoreceram o crescimento micelial do isolado de *P. amygdali*, obtendo-se assim, a faixa de temperatura ótima (Tabela 2, Figuras 4 e 5).

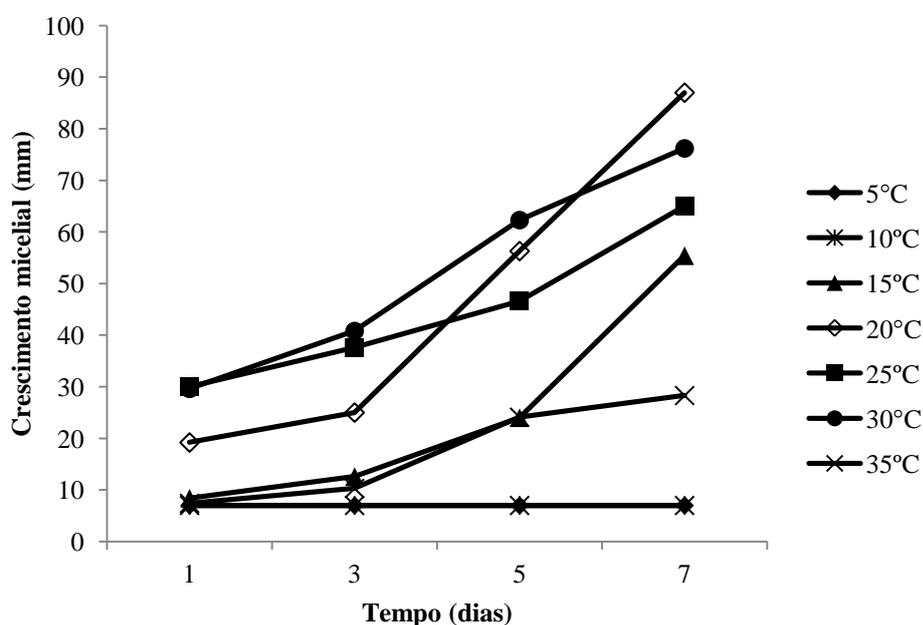


Figura 4 - Crescimento micelial (mm) de *in vitro* de *Phomopsis amygdali* em diferentes temperaturas. Ponta Grossa/PR, 2014.

A faixa ótima de temperatura para o crescimento micelial de *P. amygdali* foi de 20 a 30°C. Pôde-se notar que nas duas temperaturas mais baixas e no outro extremo avaliado, o patógeno teve seu desenvolvimento comprometido, obtendo crescimento nulo a 5 e 10°C e muito pequeno a 35°C (Figura 5).

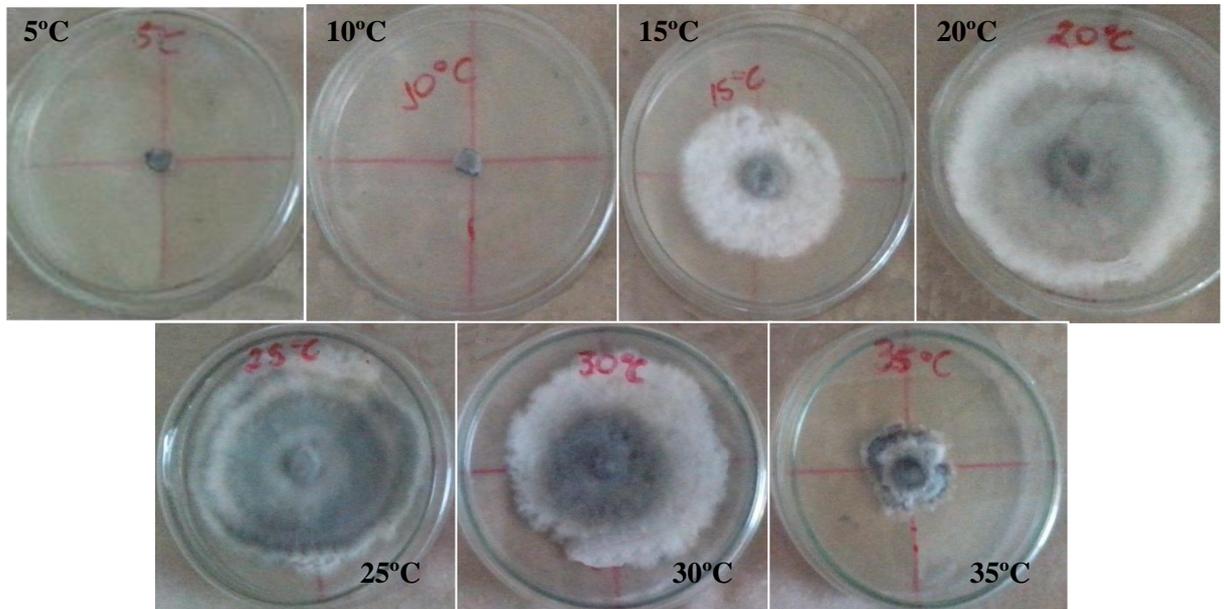


Figura 5 - Aspecto de colônias de *Phomopsis amygdali* submetidas às temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C ao final de sete dias de incubação. Ponta Grossa/PR, 2014.

O crescimento micelial de *P. amygdali* não ocorreu de forma similar quando submetidos aos sete regimes de temperatura avaliados, em vista disso, segundo os resultados da análise de variância (Tabela 2), houve diferença significativa para os meios de cultura e entre os sete regimes de temperatura avaliados.

A temperatura de 20°C obteve maior média de crescimento radial do micélio do fungo estudado e decresceu em 100%, 100%, 51% e 67% quando o fungo foi incubado nas temperaturas de 5°C, 10°C, 15°C e 35°C, respectivamente. Contudo, não foi encontrada diferença significativa entre o tamanho da colônia em milímetros nas temperaturas de 15 e 35°C (Tabela 2).

A ausência de calor para o crescimento micelial do patógeno já foi relatado para diversos fungos fitopatogênicos como *Diaporthe citri* e *Phomopsis viticola* (NOZAKI, et al., 2004). Nestes casos, a temperatura age como termo-inibidor do crescimento micelial.

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento micelial dos fungos. A faixa de temperatura de 20 - 30°C é característica das estações mais quentes do ano nas regiões de produção de pêssego como o Rio Grande do Sul e Paraná. O ótimo térmico obtido na cultura das amostras é compatível com as temperaturas ambiente em que comumente esses organismos são encontrados.

Tabela 2 - Crescimento micelial (mm) de *Phomopsis amygdali* (isolado B2), em diferentes temperaturas aos 7 dias após a repicagem. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamentos	Diâmetro (mm) ¹
20°C	81,5 a
30°C	74,0 a
25°C	59,4 ab
15°C	39,7 bc
35°C	27,2 c
10°C	0,0 d
5°C	0,0 d

¹Dados originais. Médias seguidas de mesma letra não diferiram entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As infecções de verão podem aparecer se ferimentos coincidirem com alta umidade. O desenvolvimento da infecção e a difusão das lesões são interrompidos pelas temperaturas frias inverniais, porém são retomadas com as temperaturas quentes da primavera. Existe um ciclo típico por estação, mas pode também estar presente, ao menos um ciclo secundário se as condições climáticas forem favoráveis à infecção (GARRIDO; SÔNEGO, 2005).

Os resultados encontrados no presente trabalho concordam com Cordobes (2004), onde o autor cita que os conídios germinam numa faixa de temperatura de 27 a 29°C e são liberados lentamente aos 5°C pela chuva e disseminados pelo ar. O autor ainda afirma que os picnídios são formados nos tecidos infectados e os conídios liberam os cirros durante os períodos de alta umidade.

Lalancette et al. (2003) ao testarem a produção de cirros e conídios sob umidade elevada (<95%) e diferentes temperaturas, observaram que a produção máxima de cirros e a faixa de produção de conídios de *P. amygdali* ocorreu entre as temperaturas de 19-20 e 22-23°C, respectivamente. A maioria da esporulação ocorreu entre 16 e 48 horas desde o início de período de alta umidade. A produção de conídios foi consideravelmente superior à temperatura mais elevada, após 96 h de incubação, o número de conídios por picnídios foi aproximadamente cinco vezes maior em 31°C do que a 10°C. No presente, trabalho a porcentagem de inibição do crescimento micelial na temperatura de 30°C foi similar a temperatura de 25°C que está dentro da faixa de temperatura ótima para o crescimento micelial.

5.2 EFEITO DO FOTOPERÍODO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL

As médias dos diâmetros mensurados foram de 87,4 mm, 86,3 mm, 85,0 mm e 86,7 mm para luz contínua, 10/14h, 12/12h e escuro contínuo, respectivamente (Figura 6).

A porcentagem de inibição do crescimento micelial da colônia (PIC) variou de 2,89% no tratamento com escuro contínuo a 5,56% no regime intercalar de 12/12h alternando entre luz e escuro (Tabela 3). Os resultados observados mostram que os fotoperíodos testados não afetaram o crescimento *in vitro* de *P. amygdali*, sendo este um fator não limitante para a colonização do patógeno.

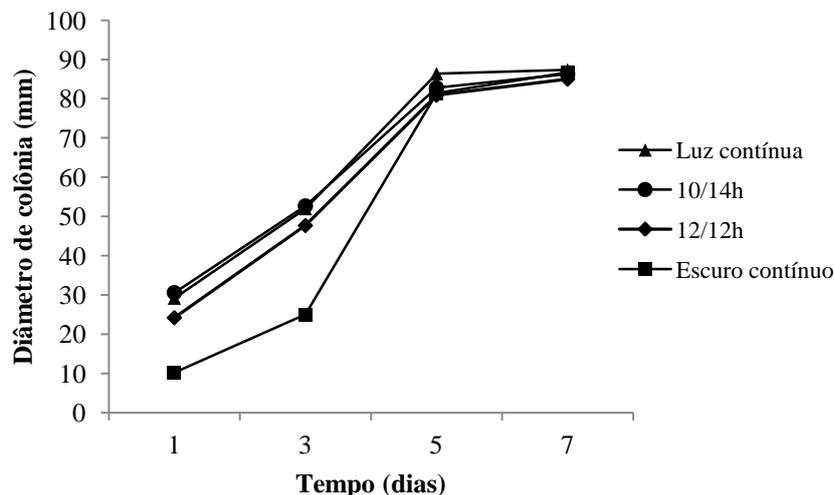


Figura 6 - Influência de diferentes fotoperíodos no crescimento micelial *in vitro* de *Phomopsis amygdali* na temperatura de 20°C. Ponta Grossa/PR, 2014.

O aspecto das colônias de *P. amygdali* sofreu alteração de cor quando submetidos aos quatro regimes de luminosidade avaliados, sendo que os tratamentos com 10/14 horas e escuro contínuo apresentaram um escurecimento na região central da colônia aos 7 dias, enquanto que os tratamentos com luz contínua e 12/12 horas tiveram o escurecimento mais lento se originando do centro para os bordos da placa (Figura 7).

Até mesmo entre isolados da mesma espécie podem ocorrer diferenças na necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos, sendo, portanto, muito variável (MASANGKAY, 2000 citado por CARNAÚBA et al., 2007).

Lalancette (2001) ao estudar o tamanho dos cancos e capacidade de esporulação sazonal de *P. amygdali* em pêssago verificou que em 1997, a capacidade de produzir cirros

aumentou significativamente do inverno, onde os dias são mais curtos, até o verão, que possui os dias longos. Em contraste, a esporulação no ano seguinte, aumentou lentamente ao longo do ano apresentando esporulação máxima no outono, indicando que *P. amygdali* atua como um estrategista, mantendo picnídios abundantes e alta capacidade de esporulação em grande parte do ano.

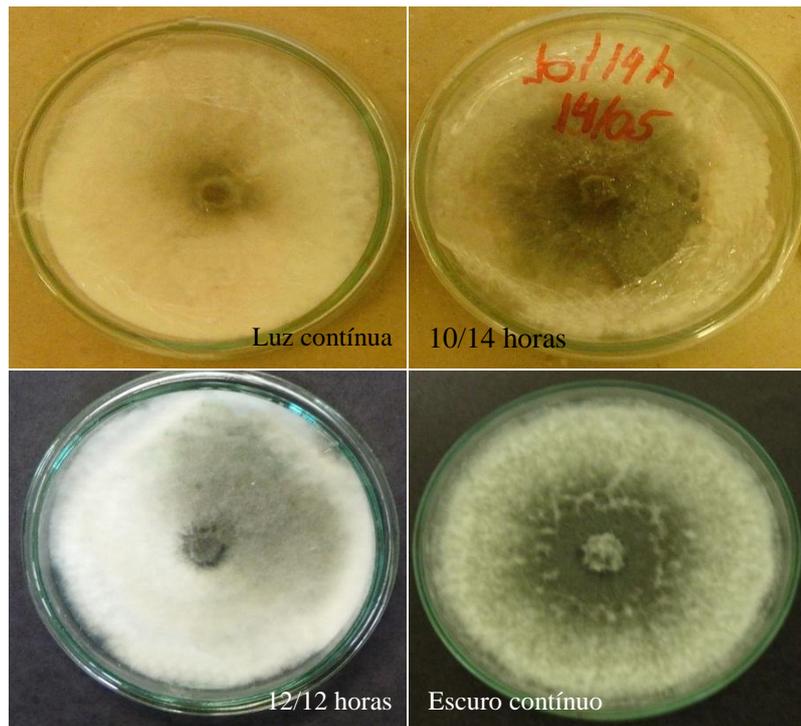


Figura 7 - Aspecto da colônia de *Phomopsis amygdali* sob os regimes de luminosidade: luz contínua, 10/14h, 12/12h e escuro contínuo. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tabela 3 - Porcentagem média de inibição de colônia (PIC) (%) de *Phomopsis amygdali* em diferentes fotoperíodos. Ponta Grossa/PR, 2014

Fotoperíodo	PIC (%)
Luz contínua	2,89 ns ¹
10/14h	4,11 ns
12/12h	5,56 ns
Escuro contínuo	3,67 ns

¹ns = Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Estes resultados concordam com o encontrado no presente estudo, pois o patógeno obteve baixa porcentagem de inibição de colônia, independente do fotoperíodo ao qual foi submetido, simulando desde os dias mais curtos (outono e inverno) aos mais longos do ano (primavera e verão).

O isolado de *P. amygdali* foi submetido nos testes posteriores à temperatura de 20°C, a qual foi a temperatura ótima para crescimento *in vitro* e fotoperíodo de 12/12h, uma vez que não houve diferença estatística entre os regimes de luminosidade estudados.

A caracterização morfológica de *P. amygdali* submetido à condição ideal de crescimento revelou que o isolado estudado apresenta formação de picnídios negros, com cirros esbranquiçados, globosos e surgindo como pontuações negras dispersas pela colônia, ostiolados, pouco protuberantes e pescoço não evidente. Os conídios encontrados são do tipo alfa, unicelulares, hialinos e cilíndricos (Figura 8).

Já as hifas encontradas são hialinas, ramificadas e septadas concordando com as informações de Regis (2014) que ainda cita que muitas vezes as hifas ainda formam clamidósporos em cadeias (Figura 9).

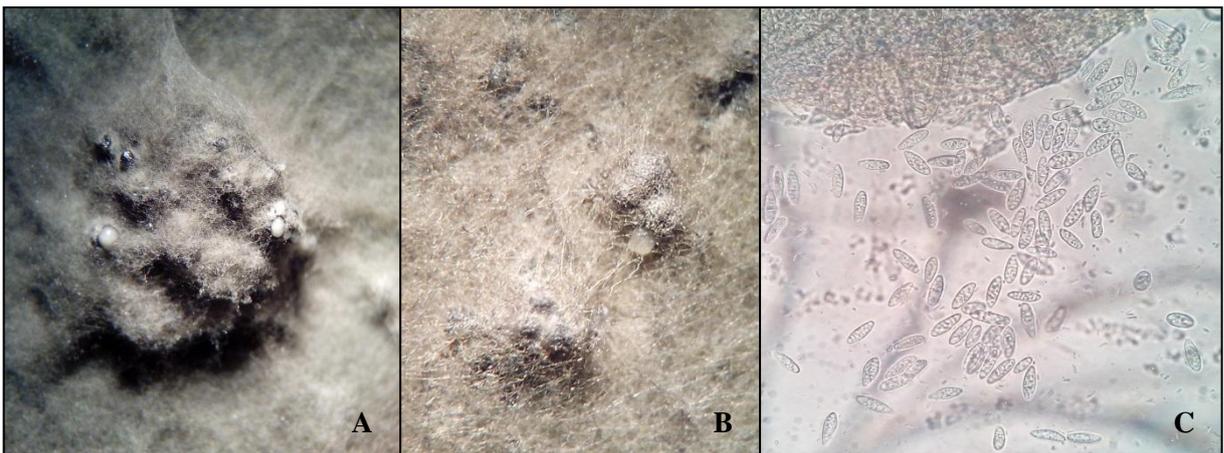


Figura 8 - Picnídios de *Phomopsis amygdali* em microscópio óptico (10X) (A e B) e conídios de *Phomopsis amygdali* em microscópio óptico (40X) (C). Ponta Grossa/PR, 2014.

5.3 SENSIBILIDADE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS VEGETAIS

Os resultados da análise de variância revelaram interação significativa entre os fatores, óleos essenciais x concentrações, sendo observadas diferenças no crescimento micelial do fitopatógeno em virtude das concentrações de cada óleo essencial utilizado. Os resultados da avaliação do potencial de óleos essenciais vegetais na inibição do crescimento micelial do patógeno *Phomopsis amygdali*, *in vitro*, estão representados na Tabela 4 e nas Figuras 10, 11 e 12.

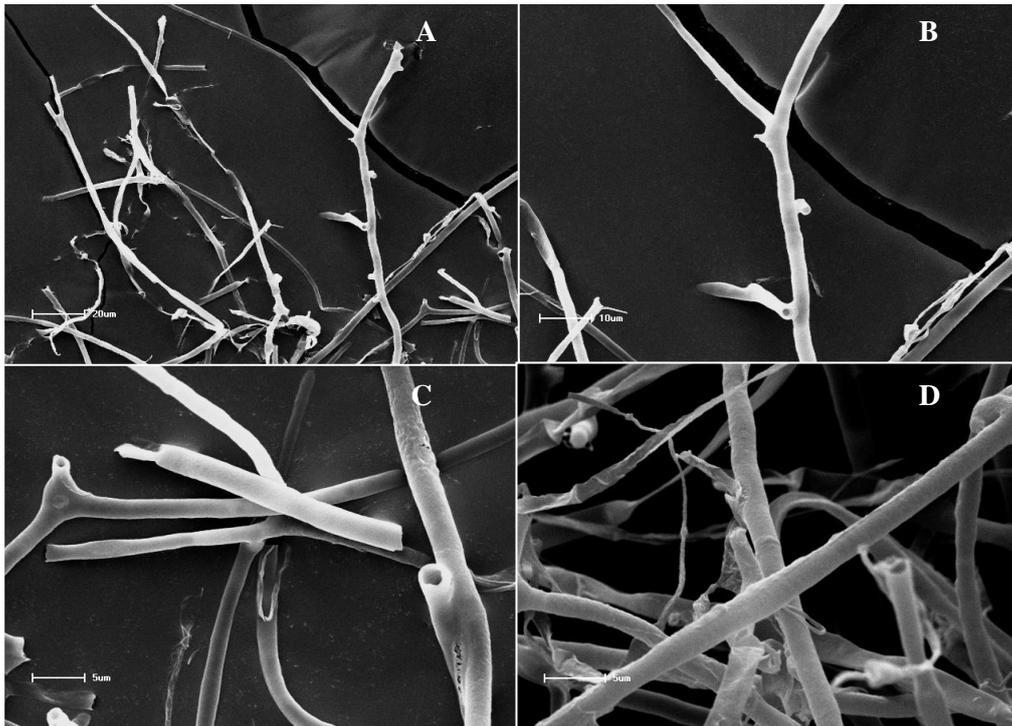


Figura 9 - Hifas de *Phomopsis amygdali* em microscópio eletrônico de varredura (A) 500X (B) 1000X (C) 2000X e (D) 2400X. Ponta Grossa/PR, 2014.

Na avaliação do potencial de inibição do crescimento micelial de *P. amygdali*, *in vitro*, o óleo essencial de orégano apresentou-se como um produto potencial, inibindo o desenvolvimento deste patógeno em 100%, em meio BDA na concentração de 20%, seguido do óleo de capim-limão que inibiu o crescimento em 95% (Tabela 4; Figuras 10 e 11). O aumento da concentração de 10 para 20% aumentou significativamente a eficiências dos dois óleos.

Foi observada uma supressão parcial de *P. amygdali* na presença dos óleos essenciais de menta (33,44%) e gengibre (19,44%), na concentração de 20%, camomila de 20,67 e 17,9% e alecrim de 7,1 e 18,33% nas concentrações de 10 e 20%, respectivamente.

O desenvolvimento micelial de *P. amygdali* quando submetido ao tratamento com óleo essencial de camomila, promoveu um aumento linear do PIC, com o aumento das concentrações utilizadas (Figura 11B). Os óleos de citronela e menta apresentaram comportamento semelhante quanto à redução do crescimento micelial do patógeno, porém com uma redução quadrática (Figura 11A).

Sete dias após a repicagem, verificou-se que o crescimento micelial foi inibido, comprovando-se, portanto, o efeito fungistático dos óleos essenciais de capim limão, orégano,

citronela, camomila e menta. Os resultados obtidos mostraram que os óleos de gengibre, alecrim eucalipto e cravo não apresentaram inibição do crescimento micelial do fungo *P. amygdali* nas concentrações utilizadas (Figura 12 e 13).

Tabela 4 - Porcentagem de inibição de colônia (PIC) dos óleos essenciais vegetais sobre *Phomopsis amygdali* em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamentos	1%	5%	10%	20%
gengibre	11,9 Aba*	2,4 Ba	8,5 ABa	19,4 Abc
capim limão	1,7 Ba	0,2 Ba	16,1 Ba	95,0 Aa
citronela	1,3 Ba	4,2 ABa	15,8 Aa	16,7 Abc
alecrim	16,0 ABa	0,3 Ba	7,1 ABa	18,3 Abc
camomila	2,1 Ba	5,8 ABa	17,9 Aa	20,7 Abc
eucalipto	0,4 Aa	12,0 Aa	2,0 Aa	4,1 Ac
cravo-da-Índia	0,0 Aa	1,7 Aa	10,0 Aa	4,7 Ac
orégano	0,2 Ba	1,8 Ba	9,8 Ba	100,0 Aa
menta	0,0 Ba	2,8 Ba	4,9 Ba	33,4 Ab

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

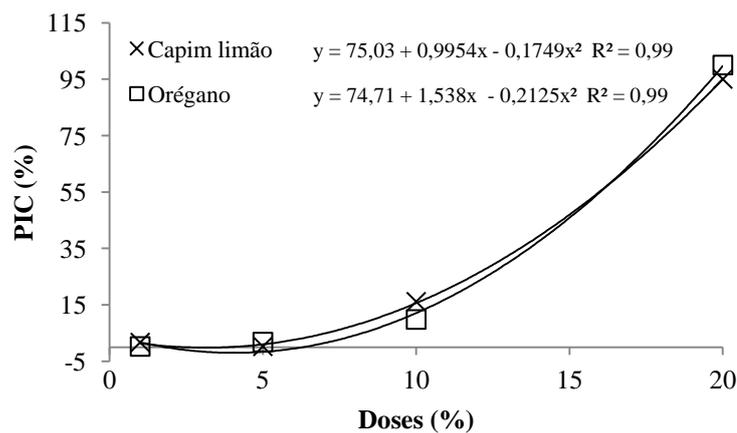


Figura 10 - Porcentagem de inibição de colônia (PIC) *in vitro* de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e orégano (*Origanum vulgare*). Ponta Grossa/PR, 2014.

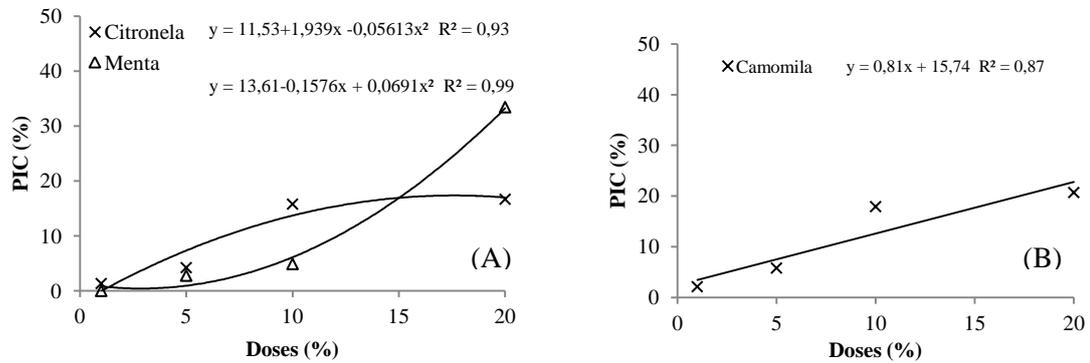


Figura 11 - Desenvolvimento de colônias *in vitro* de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon winterianus*) e menta (*Mentha spp.*) (A) e camomila (*Chamomila recutita*) (B). Ponta Grossa/PR, 2014.

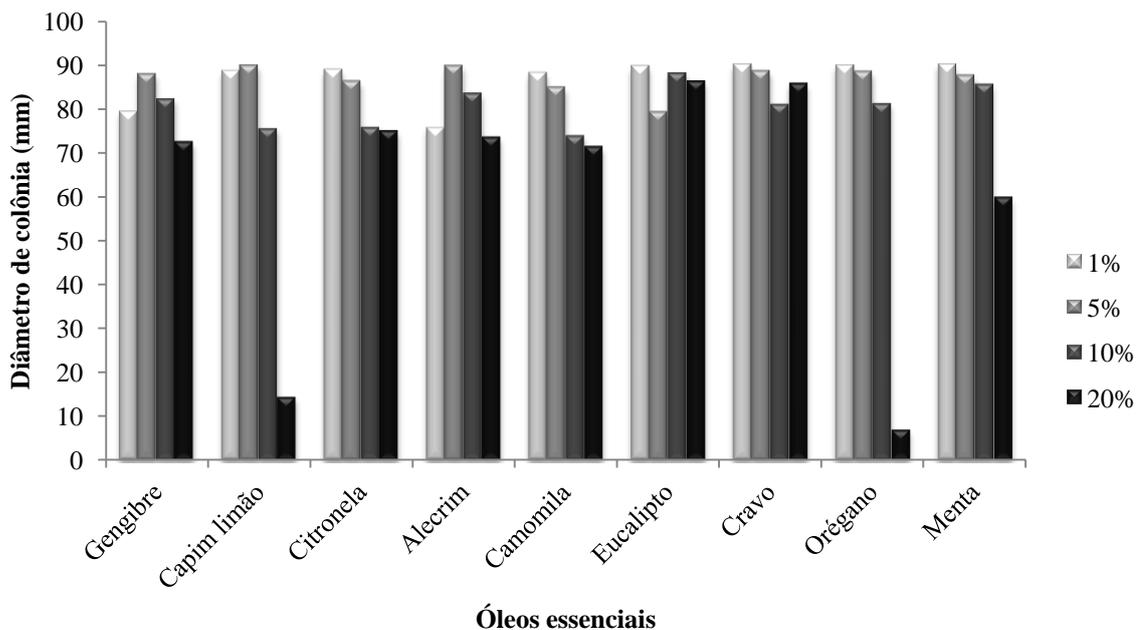


Figura 12 - Diâmetro de colônias, *in vitro*, de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos óleos essenciais vegetais em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

O efeito no crescimento micelial de *P. amygdali*, submetido ao meio de cultura com adição dos óleos essenciais de orégano e capim-limão apresentaram respostas semelhantes com o aumento das concentrações utilizadas, verificando-se menor diâmetro da colônia fúngica nas maiores concentrações. A inibição, provavelmente, ocorreu devido à presença de compostos fixos com ação fungitóxica (Figura 13). Assim, o aumento do potencial de inibição

dos óleos de orégano e capim-limão sobre *P. amygdali*, pode estar associado à volatilização dos compostos destes óleos modificando o ar atmosférico no interior das placas de Petri.

Para cravo-da-índia, eucalipto, gengibre e alecrim os diâmetros finais de colônia foram 85,5, 86,3, 72,5 e 73,5 mm, respectivamente. Estes resultados comprovam que os referidos óleos essenciais e seus compostos secundários, não exerceram efeito sobre *P. amygdali*.

Rozwalka et al. (2008) verificaram total inibição do crescimento de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* com o uso do extrato aquoso de cravo-da-índia na concentração de 10%. Os autores afirmaram ainda que, em experimento prévio, o extrato aquoso na concentração de 1% apresentou-se igualmente eficiente.

Inácio et al. (2009) também foram divergentes em seus resultados quando testaram óleo de citronela sobre *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*. Eles verificaram que ocorreu a inibição no desenvolvimento *in vitro* do patógeno, avaliado no sétimo dia, porém nos testes *in vivo*, não obtiveram sucesso no controle.

Oliveira et al. (2006) ao testar diferentes concentrações de óleo de copaíba (*Copaifera* spp) para o fungo *Phomopsis* sp. *in vitro*, verificaram que as doses utilizadas apresentaram eficiência na redução do crescimento micelial, porém inferiores se comparadas com *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora* sp.

Por outro lado, os dados obtidos para capim-limão no presente estudo, estão de acordo com os encontrados por Santos (2014), onde o óleo essencial de capim-limão mostrou efeito satisfatório no controle do fungo *Phomopsis sojae*, inibindo em 100% o crescimento micelial *in vitro* e não influenciou na qualidade fisiológica das sementes de soja, mostrando um potencial de uso no tratamento de sementes.

Os resultados positivos para orégano e capim-limão podem ter sido influenciados pela presença de vários compostos com ação antimicrobiana. Romero et al. (2012) analisaram os componentes majoritários do óleo de orégano e chegaram a cinco principais (4-terpineol (8,3%), acetato de linalila (2,0%), timol (32,0%), carvacrol (50,0%) e espatulenol (4,1%). O óleo de capim-limão possui como principal componente o citral (geranial + neral) num teor de 65,45% (GUIMARÃES et al., 2011). O citral possui conhecida ação bactericida e antimicótica (SADDIQ et al., 2010), conseqüentemente, a atividade antifúngica dos óleos pode ser resultado da ação destes terpenos. A inibição de fungos por óleos essenciais pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação como efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular.

Trabalhos relatando o efeito de óleos essenciais de plantas sobre o crescimento micelial de *P. amygdali*, bem como as concentrações mínimas inibitórias ao fungo, são escassos na literatura. Apesar de uma redução significativa no desenvolvimento *in vitro* do patógeno em estudo, é necessária a realização de novos testes *in vitro* e *in vivo* para obtenção de um produto eficiente no controle de *P. amygdali*.

5.4 SENSIBILIDADE A DIFERENTES SUBSTÂNCIAS DE *Calea hispida*

Neste trabalho foi analisada a sensibilidade do crescimento micelial do isolado de *P. amygdali* em diferentes concentrações das substâncias extraídas de *Calea hispida*: quercitrina (CHAM – *Calea hispida* acetato metanólico), 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (CHCR – *Calea hispida* cristais), extrato aquoso (CHEA - *Calea hispida* extrato aquoso) e óleo essencial (CHOE - *Calea hispida* óleo essencial) (Tabela 5).

Os dados obtidos nesse estudo apontaram uma maior porcentagem de inibição de colônia (PIC) para CHOE seguido de CHCR contra o fungo *P. amygdali*, com 21,9% na concentração 1% para CHOE e 11,8% na concentração 5% para CHCR (Tabela 5). Por sua vez, para o CHAM e CHEA as porcentagens de inibição calculadas foram menores com 3,4% na concentração 1% para CHAM e 0,7% na concentração 3% para CHEA, respectivamente. Nenhum tratamento inibiu em 100% o desenvolvimento do patógeno.

Tabela 5 - Porcentagem de inibição de colônia (PIC) de *Phomopsis amygdali* contendo os tratamentos com *Calea hispida* em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamentos	1%	3%	5%	7%	10%
CHOE ¹	21,9 Aa	2,1 Ca	10,9 Ba	5,3 BCab	4,0 BCa
CHEA ²	0,3 Ab	0,7 Aa	0,6 Ab	0,0 Ab	0,1 Aa
CHCR ³	2,8 Cb	0,1 Ca	11,8 Aa	9,6 Aba	5,2 BCa
CHAM ⁴	3,4 Ab	5,0 Aa	0,0 Ab	0,2 Ab	0,6 Aa

¹ CHOE – *Calea hispida* óleo essencial, ²CHEA – *Calea hispida* extrato aquoso, ³CHCR – *Calea hispida* cristais e ⁴CHAM – *Calea hispida* acetato metanólico; *Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

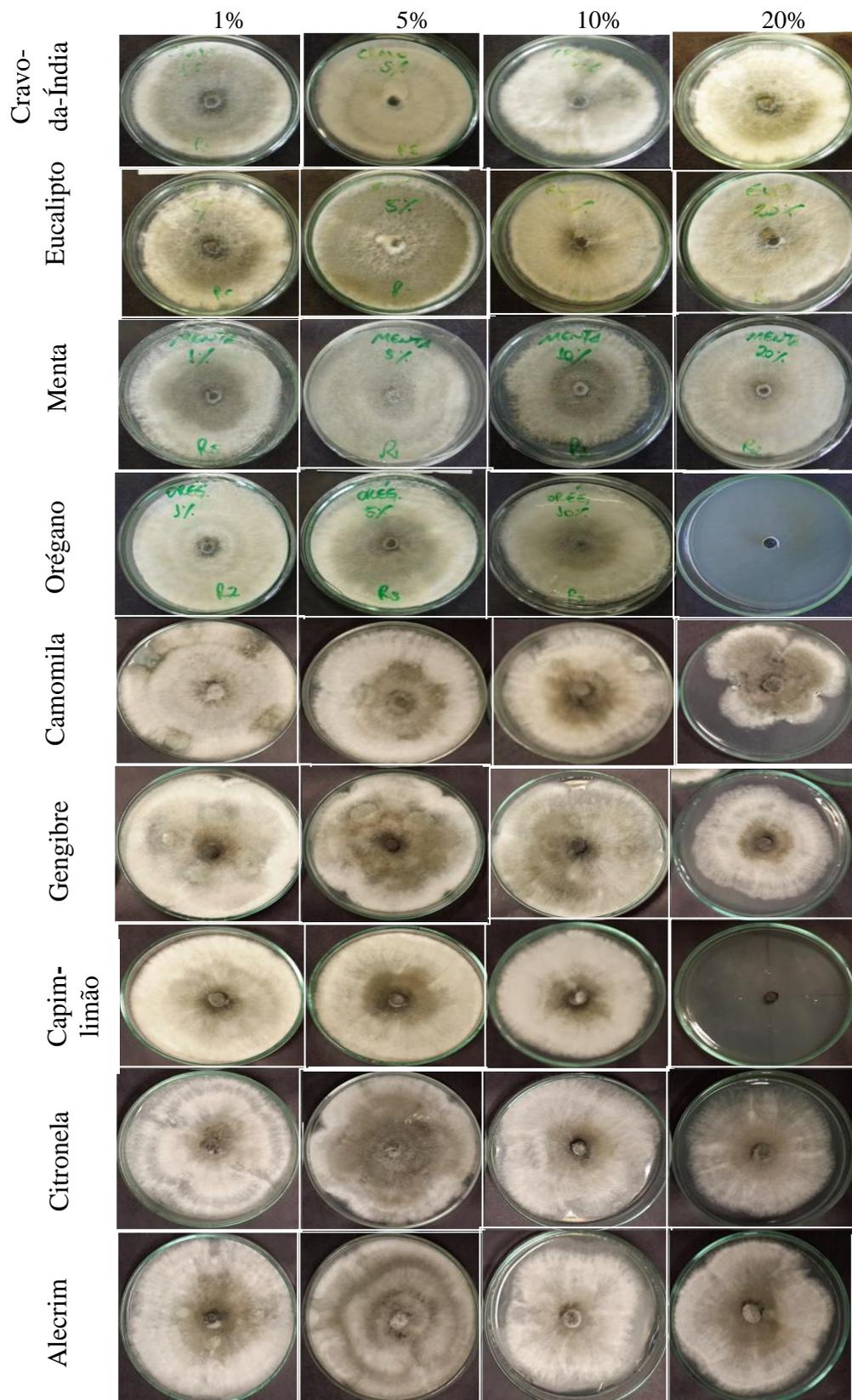


Figura 13 - Crescimento micelial de *Phomopsis amygdali*, *in vitro*, em meio BDA, contendo óleos essenciais vegetais em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

As médias de porcentagem de inibição (PIC) se ajustaram de forma quadrática na análise de regressão para CHOE (óleo essencial) e CHCR (cristais) (Figura 14). Os produtos extraídos de *Calea hispida* CHOE e CHCR apresentaram efeito inibitório do crescimento micelial do patógeno nas concentrações testadas. Em relação à CHAM e CHEA, não foram observadas interações entre doses x substâncias.

No presente trabalho, os valores de índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) variaram de 9,9 a 13,0, sendo o valor mínimo para CHOE a 1% e o máximo valor para CHAM a 10% (Tabela 6).

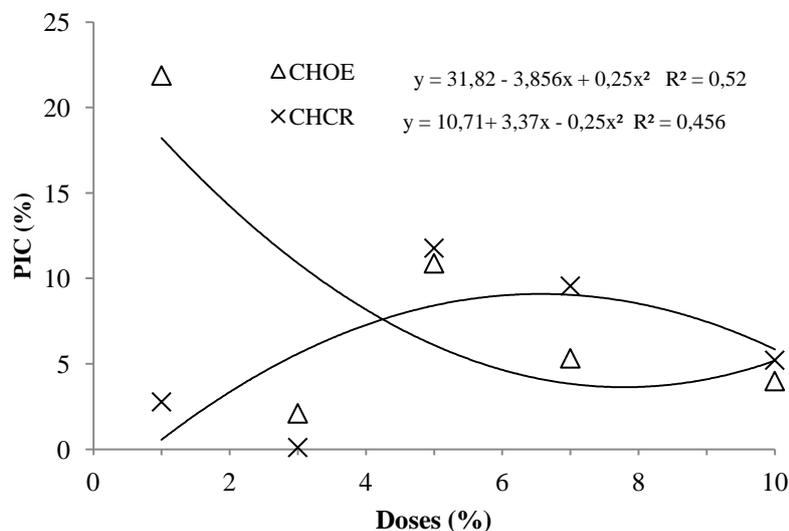


Figura 14 - Porcentagem de inibição de colônia (PIC) *in vitro* de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos diferentes produtos de extração de *Calea hispida* em diferentes doses. Ponta Grossa/PR, 2014.

Não se observou, portanto, uma relação direta entre redução dos índices de velocidade de crescimento micelial e concentrações de *C. hispida* e modos de extração utilizados nos testes *in vitro*. O tratamento com CHOE a 1% e CHCR a 5% apresentaram diâmetros de 70,3 mm e 79,4 mm, respectivamente, porém sem inibição total em nenhuma dose testada (Figura 15 e 16).

Estudos anteriores relataram a redução do desenvolvimento micelial de *Alternaria tagetica*, utilizando extratos da haste de *Calea* sp, atingindo percentuais de inibição de até 61%. Ao utilizar as raízes, o percentual de controle encontrado foi de 59% sobre o mesmo patógeno (GAMBOA-ÂNGULO et al., 2008). Os mesmos autores ainda encontraram que os percentuais de redução micelial do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* submetidos aos extratos das raízes e das hastes de *Calea* sp, foram de 44 e 48%, respectivamente. Resultados

opostos foram encontrados por Nascimento et al. (2008), onde os compostos isolados de *Calea* sp. exibiram atividade antifúngica principalmente contra patógenos humanos dermatófitos.

Tabela 6 - Índice de Velocidade de Crescimento micelial (IVCM) de colônias de *Phomopsis amygdali* contendo os tratamentos com *Calea hispida* em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamentos	0%	1%	3%	5%	7%	10%
CHOE ¹	12,5	9,9	13,1	11,6	12,3	12,6
CHEA ²	12,5	12,6	12,8	12,6	12,7	12,8
CHCR ³	12,5	12,5	12,9	10,9	11,5	12,3
CHAM ⁴	12,5	12,4	12,3	12,8	12,8	13,0

¹CHOE – *Calea hispida* óleo essencial, ²CHEA – *Calea hispida* extrato aquoso, ³CHCR – *Calea hispida* cristais e ⁴CHAM – *Calea hispida* acetato metanólico.

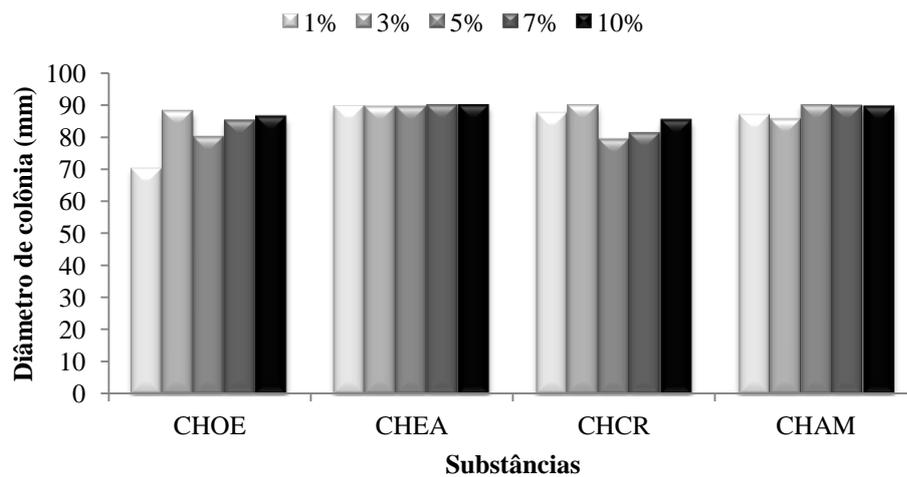


Figura 15 - Diâmetro de colônias, *in vitro*, de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos produtos da extração de *Calea hispida* em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014. Legenda: CHOE – *Calea hispida* óleo essencial, CHEA – *Calea hispida* extrato aquoso, CHCR – *Calea hispida* cristais e CHAM – *Calea hispida* acetato metanólico.

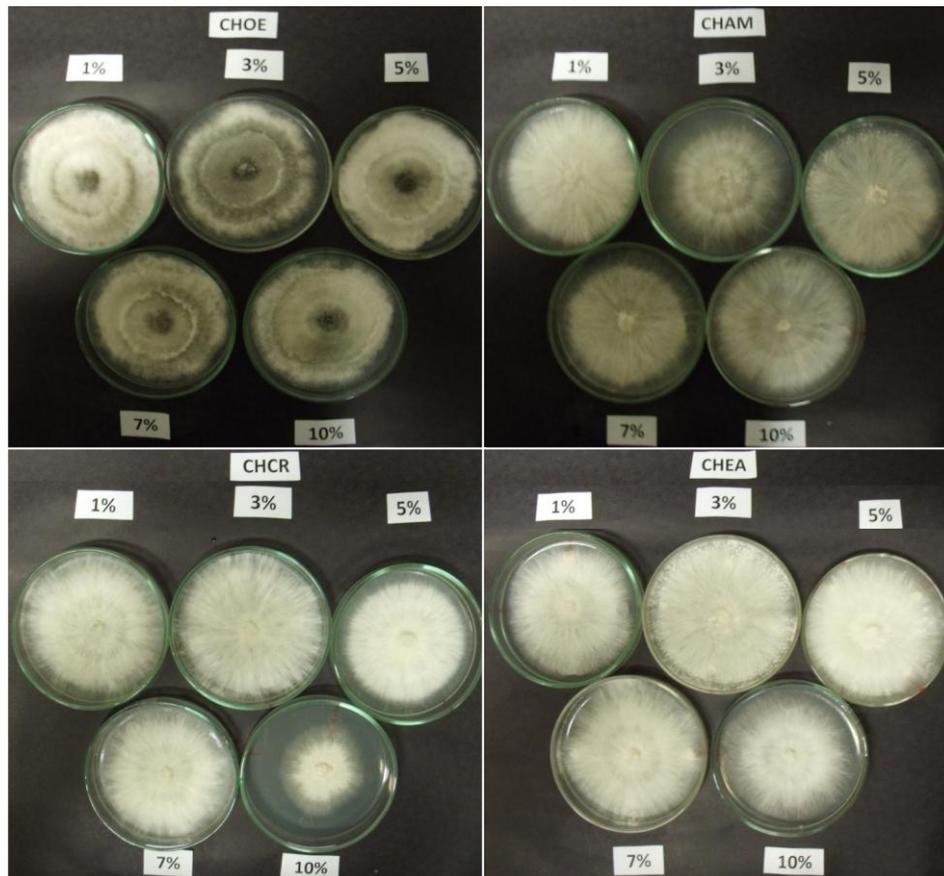


Figura 16 - Aspecto de colônia de *P. amygdali*, *in vitro*, em meio BDA, contendo os tratamentos com substâncias extraídas de *Calea hispida* em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014. Legenda: CHOE – *Calea hispida* óleo essencial, CHEA – *Calea hispida* extrato aquoso, CHCR – *Calea hispida* cristais e CHAM – *Calea hispida* acetato metanólico.

Flach et al. (2002) reportaram atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Calea clematidea* contra *Trichophyton* spp., *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum* spp., concordando com os dados encontrados neste experimento.

Diferenças na atividade antifúngica podem ser explicadas pela composição química, região geográfica de coleta de planta, idade da planta, método de extração ou o método usado para avaliar a atividade antifúngica mesmo sendo plantas da mesma espécie (CRUZ et al, 2007; MAKSIMOVIC et al., 2008).

Na literatura, ainda são escassos os trabalhos referentes à espécie *Calea hispida*, tal como seu potencial de inibição de patógenos.

5.5 SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E OUTROS PRODUTOS

Houve interação significativa para os produtos testados e concentrações, com exceção do *Ascophyllum nodosum*, evidenciando diferenças na sensibilidade entre os produtos, bem como para as concentrações no crescimento de *P. amygdali* em meio BDA, sob condições controladas (temperatura 20°C e fotoperíodo 12/12h) (Tabela 7 e 8 e nas Figuras 17, 18, 19 e 20). De modo geral, maiores inibições do crescimento micelial foram obtidas nas concentrações mais elevadas. Verificou-se efeito crescente na atividade antifúngica dos fungicidas captan, ciproconazol, tebuconazol e mancozeb com o aumento das concentrações até 100 ppm, não sendo constatado crescimento do patógeno a partir desta concentração.

O tratamento com hipoclorito de sódio proporcionou nível de inibição intermediário no crescimento micelial, contudo, ainda assim, foi superior à testemunha. Os fungicidas captan, ciproconazol, tebuconazol, triadimenol, mancozeb e o bioinseticida *Bacillus thuringiensis* apresentaram as maiores porcentagens inibitórias do crescimento micelial atingindo de 82,11 a 100% a 1000 ppm. O hipoclorito de sódio proporcionou níveis de inibição de 53,22 e 48,11% nas concentrações de 500 e 1000 ppm, respectivamente, não diferiram entre si e foram superiores as demais concentrações testadas.

O tratamento com *A. nodosum* apresentou baixo efeito fungistático em *P. amygdali* com valores muito próximos a zero (Tabela 7). Responsável pela síntese da fitoalexinas e peroxidases em processos de indução de resistência (LIZZI, 1998), a alga *A. nodosum* proporcionou uma faixa de 0 a 0,9% de PIC desde 1 ppm até 1000 ppm, evidenciando-se baixo incremento na inibição pelo aumento da concentração do ingrediente ativo.

O índice de velocidade de crescimento micelial de *A. nodosum* variou de 0,0 nas dosagens onde a inibição foi completa a 10,9 no tratamento com mancozeb a 1 ppm, onde a inibição micelial foi baixa (Tabela 8). Na dose de 1 ppm, com exceção de tebuconazol, os produtos apresentaram IVCN com valores entre 8,0 e 10,9. Já para o controle sem fungicida, o valor de IVCN foi de 9,7. Os índices chegam a zero ou valores próximo com a inibição total causada por captan, ciproconazol, tebuconazol, triadimenol, mancozeb e *B. thuringiensis*, na dose de 1000 ppm (Tabela 8).

Os fungicidas captan, ciproconazol e tebuconazol apresentaram aumento na porcentagem de inibição de colônia de *P. amygdali* a partir da menor concentração avaliada e

total supressão do crescimento micelial do fungo com a utilização de concentrações superiores a 500 ppm (Figura 17).

Tabela 7 - Porcentagem de inibição de colônia (PIC) de *Phomopsis amygdali* contendo os tratamentos com produtos em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamento	1 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
captan	0,5 Cd*	3,0 Ce	83,7 Bbc	96,4 Aa	100,0 Aa
ciproconazol	18,2 Db	69,0 Cb	86,2 Bb	100,0 Aa	100,0 Aa
tebuconazol	75,7 Ba	90,8 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa
triadimenol	8,7 Dc	51,0 Cc	76,0 Bc	83,9 Ab	82,1 ABb
mancozeb	2,1 Ded	11,8 Cd	61,2 Bd	100,0 Aa	100,0 Aa
<i>B. thuringiensis</i>	22,2 Cb	0,6 De	6,2 De	63,0 Bc	83,3 Ab
hipoclorito de sódio	3,7 Bcd	1,7 Be	2,6 Be	53,2 Ac	48,1 Ac
<i>A. nodosum</i>	0,0 Ad	0,0 Ae	0,9 Ae	0,1 Ad	0,0 Ad

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferiram entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8 - Índice de Velocidade de Crescimento micelial (IVCM) de colônias de *Phomopsis amygdali* contendo os tratamentos com fungicidas e outros produtos em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Tratamentos	0 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
captan	9,7	10,4	10,6	1,6	0,2	0,0
ciproconazol	9,7	8,5	2,8	0,8	0,0	0,0
tebuconazol	9,7	1,7	0,2	0,0	0,0	0,0
triadimenol	9,7	9,5	4,7	2,1	1,1	1,3
mancozeb	9,7	10,9	10,1	3,9	0,0	0,0
<i>B. thuringiensis</i>	9,7	8,0	9,9	9,5	3,5	1,1
hipoclorito de sódio	9,7	9,5	9,0	9,8	4,5	5,5
<i>A. nodosum</i>	9,7	7,5	8,9	8,7	9,4	8,9

Os fungicidas que agem no bloqueio na biossíntese de ergosterol (ciproconazol e tebuconazol) apresentaram significativa superioridade para o critério crescimento micelial. Entretanto, o fungicida triadimenol, pertencente ao grupo dos triazóis, não se destacou em relação aos de modo de ação similar, atingindo o percentual de 82,11 aos 7 dias de incubação (Figura 18).

O fungicida mancozeb, típico fungicida de contato, apesar de sua baixa fungitoxicidade inerente, apresentou nível de inibição elevado (100%) a partir da concentração de 500 ppm (Figura 18). O mancozeb age na planta inibindo o processo

respiratório a nível enzimático e, provavelmente, a redução no crescimento micelial observada pelo fungicida, deve-se ao mecanismo de ação deste fungicida.

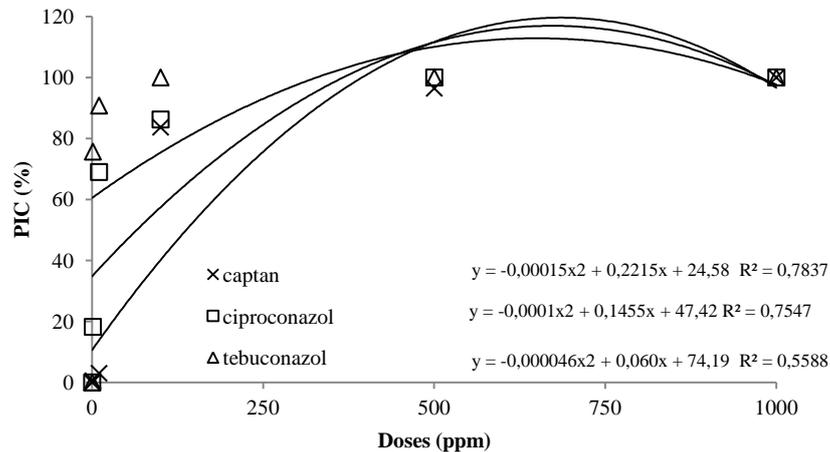


Figura 17 - Porcentagem de inibição de colônias (PIC) in vitro de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos fungicidas captan, ciproconazol e tebuconazol em diferentes dosagens. Ponta Grossa/PR, 2014.

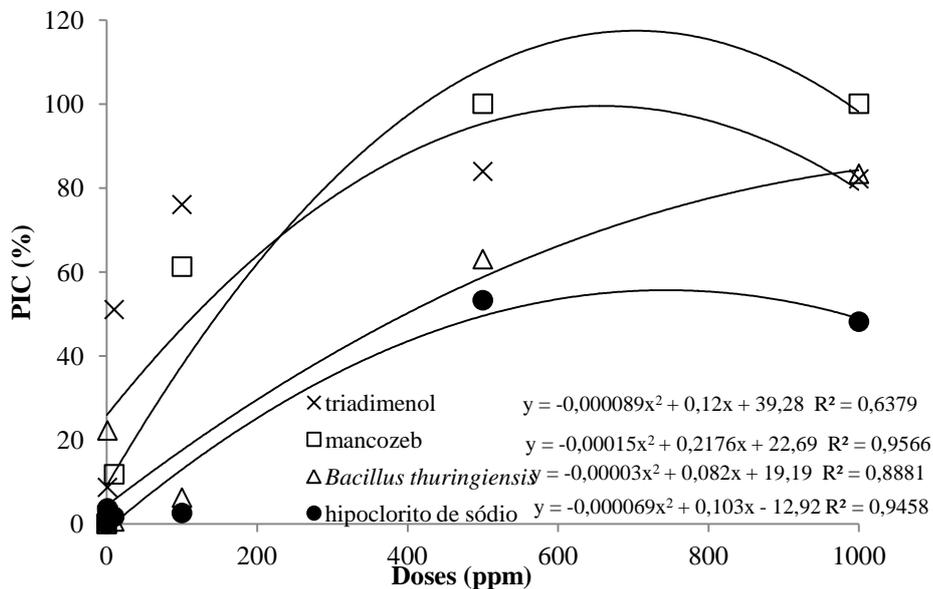


Figura 18 - Porcentagem de inibição de colônias (PIC) de colônias in vitro de *Phomopsis amygdali*, submetidas aos fungicidas triadimenol e mancozeb, e os produtos *Bacillus thuringiensis* e hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

O produto a base de *B. thuringiensis*, apresentou porcentagens de inibição de colônia no valor de 22,22; 0,56; 6,22; 63,0 e 83,33% para 1, 10, 100, 500 e 1000 ppm, respectivamente. Por meio da análise de regressão verificou-se que o hipoclorito de sódio

apresentou aumento da PIC de *P. amygdali*, porém, ao fim dos 7 dias de incubação, apresentou controle intermediário, com 48,11% de inibição (Figura 18 e Tabela 7).

Todos os produtos que apresentaram interação significativa entre doses x produtos, promoveram um aumento quadrático sobre o PIC de *P. amygdali*, com o aumento das concentrações utilizadas (Figuras 17 e 18).

Em relação ao diâmetro de colônias (Figura 19), o crescimento foi maior nos tratamentos com as menores concentrações variando de 70 a 90 mm. Como exceção, o tratamento com tebuconazol apresentou diâmetro de 21,9 mm já na concentração de 1 ppm. Por outro lado, menores valores de diâmetro micelial foram observados em 500 e 1000 ppm, com exceção do *A. nodosum* que, mesmo na concentração de 1000 ppm apresentou diâmetro final de 90 mm.

Estes resultados demonstram baixo efeito fungistático para o produto à base de *A. nodosum*, apresentando os valores mais baixos no controle *in vitro* de *P. amygdali*. Jayaraman et al. (2010) ao testar aplicações de *A. nodosum* na concentração de 1% alternadas com o fungicida clorotalonil a 2 g L⁻¹ duas vezes em intervalos de 10 dias, verificaram uma redução significativa da incidência de *Alternaria* spp e *Fusarium* spp e ainda apresentaram melhoria das atividades enzimáticas relacionadas com a defesa, incluindo quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase, polifenol oxidase, fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase. Níveis de transcrição alterados de vários genes de defesa, incluindo a quitinase, lipoxigenase, glucanase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase foram observados em plantas tratadas, divergindo dos resultados aqui encontrados.

Resultados similares foram encontrados por Regis (2014) ao testar fungicidas *in vitro* no controle de *P. amygdali*. O autor verificou que, dos fungicidas testados, o ciproconazol, pertencente ao grupo dos sistêmicos (triazóis) se mostrou muito tóxico para o crescimento do fungo, enquanto o fungicida captan (grupo químico nitrogenados heterocíclicos) é o mais tóxico para os de contato, com uma EC50 de 4,32 ppm, seguido por mancozeb (grupo químico ditiocarbamatos) e tiram (grupo químico dimetilditiocarbamato). Neste trabalho, fungicidas sistêmicos como o triadimenol, ciproconazol e tebuconazol, geralmente considerados como curativos, mostraram uma redução de 82,1, 100 e 100 e %, respectivamente, no crescimento micelial, mesmo em concentrações baixas *in vitro*.

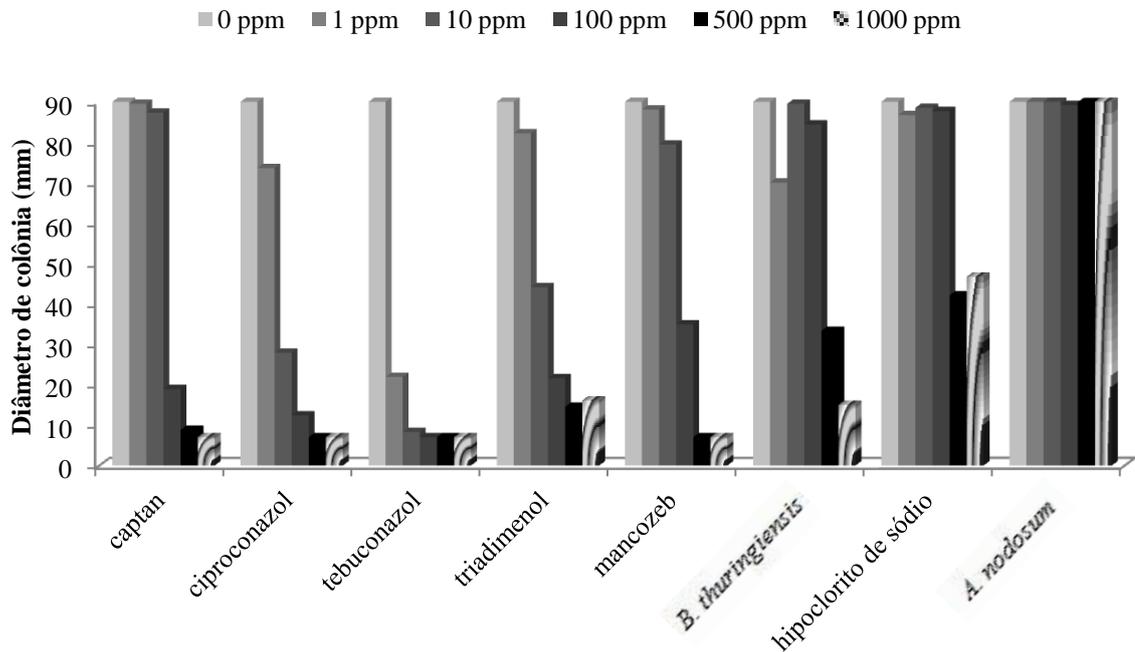


Figura 19 - Diâmetro de colônias, *in vitro*, de *Phomopsis amygdali*, submetidas a fungicidas e outros produtos, em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, podem não ser correspondentes com aqueles obtidos no campo, por influência do isolado testado, condições ambientais (temperatura, radiação solar, umidade e vento) e condições fisiológicas e nutricionais da árvore (condições de manejo do solo e manejo de plantações). Alguns fungicidas como o captan, ajudam a prevenir o cancro dos ramos se aplicado de maneira preventiva, atuando no inóculo inicial da doença (CORDOBES, 2004; GARRIDO; SÔNEGO, 2005).

Garrido e Sônego (2005) comentam que alguns fungicidas podem prevenir a queima dos ramos quando aplicados antes da infecção e recomendam, para proteção dos ferimentos, efetuar a aplicação de fungicidas a base de tebuconazol, captan ou mancozeb após a poda. Os autores alertam ainda que a partir do momento em que houve o aparecimento dos sintomas de murcha e seca dos ramos, o controle químico não tem mais qualquer efeito.

O aumento da dose dos fungicidas testados neste experimento foi inversamente proporcional ao crescimento micelial. Estes dados corroboram com os resultados de Thomidis e Michailides (2009b), que encontraram que o fungicida tebuconazol inibiu em 100% o crescimento micelial de *P. amygdali* na dose de 187,5 mg L⁻¹ e também concordam com os resultados de Lalancette (2002), que observou que o captan reduziu a incidência de cancos de *P. amygdali* em até 69%.

Para o hipoclorito de sódio, os resultados aqui encontrados foram de média a baixa inibição, discordando de Picolotto et al. (2007) que afirmam que o hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% tem boa eficiência como desinfestante na contaminação fúngica, proporcionando redução nas taxas de contaminação em sementes de jabuticabeira *in vitro*.

Ao fim dos sete dias de incubação, *B. thuringiensis* proporcionou inibição de 83,33% no crescimento micelial. Batista Junior et al. (2002) também encontraram propriedade fungicida de *B. thuringiensis* para três isolados patogênicos de *Fusarium* sp, o que indica que possui atividade antifúngica e abre um novo campo de estudo para a utilização do bioinseticida.

Sugerem-se no fim deste experimento que sejam testados novos produtos e novas concentrações no controle do agente causal da queima dos ramos do pessegueiro, a fim de gerar novas estratégias de manejo do patógeno.

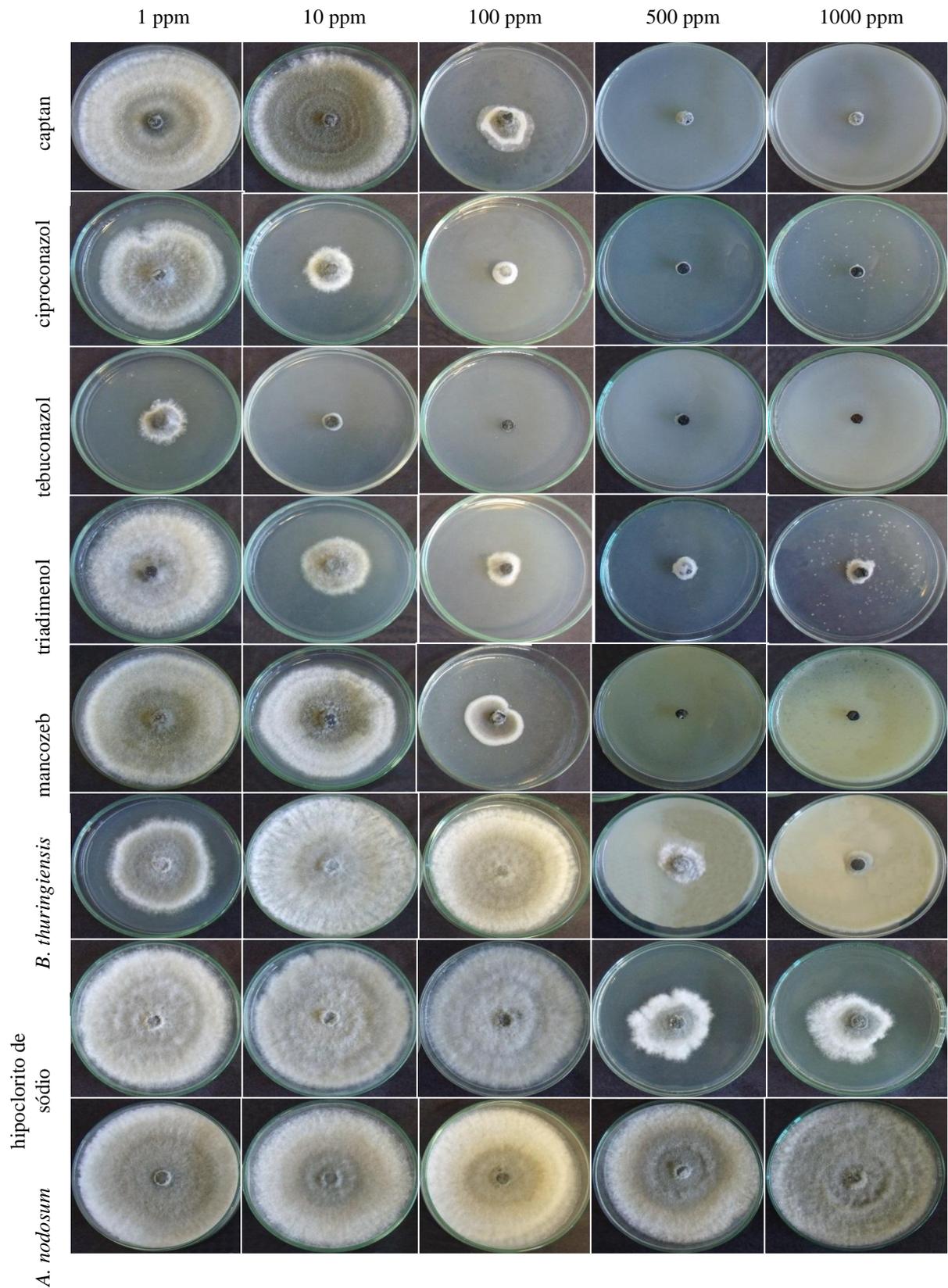


Figura 20 - Aspecto de colônias de *Phomopsis amygdali*, *in vitro*, em meio BDA, contendo os tratamentos com fungicidas e outros produtos, em diferentes concentrações. Ponta Grossa/PR, 2014.

6 CONCLUSÕES

- A faixa de temperatura que favoreceu o desenvolvimento micelial *in vitro* de *Phomopsis amygdali* foi de 20 a 30°C.
- Os fotoperíodos testados não interferiram no desenvolvimento do patógeno.
- Os óleos essenciais de orégano e capim-limão nas concentrações de 20% proporcionaram maiores inibições do crescimento micelial de *P. amygdali*.
- Os óleos essenciais de orégano e capim-limão nas doses de 20% podem ser usados como método alternativo para o controle de *P. amygdali*, pois estes apresentam sensibilidade aos compostos existentes nesses óleos vegetais.
- Para os produtos derivados da planta *Calea hispida*, apenas *Calea hispida* óleo essencial (CHOE) e o *Calea hispida* cristais (CHCR), apresentaram efeito no crescimento micelial de *P. amygdali*, porém com baixa porcentagem de inibição.
- As maiores atividades antifúngicas sobre *P. amygdali* foram obtidas para os fungicidas ciproconazol, tebuconazol, mancozeb e captan.
- A alga *Ascophyllum nodosum* não demonstrou atividade antifúngica nas concentrações testadas.
- O bioinseticida *Bacillus thuringiensis* demonstrou inibição significativa sobre *P. amygdali* na concentração de 1000 ppm.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2008.

ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H.; CONNELL, J. H. First report of fruit rot and associated branch dieback of almond in California caused by a *Phomopsis* species tentatively identified as *P. amygdali*. **Plant Disease**, Riverside, v. 83, n. 11, p. 1073, 1999.

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofitcons/principalagrofitcons>>. Acesso em: 10 mai. 2014.

ALLÈGRE, M. HÉLOIR, M.C.; TROUVELOT, S.; DAIRE, X.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D.; ADRIAN, M. Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? **Molecular Plant and Microbes Interactions**, v. 22, n. 8, p. 977-986, 2009.

ASSISTAT. **Programa de análises estatísticas**. Versão 7.7. Campina Grande/PB: UAEG-CTRN-UFMG, 2008.

BARBOSA, W.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; SAMPAIO, V. R.; BANDEL, G. **Ecofisiologia do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do pessegueiro em região subtropical**. Campinas/SP: Instituto Agrônômico, 37 p. 1990. (Documentos, IAC 17).

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 3. ed. Viçosa/MG: Editora Universitária UFV, 1991. 326 p.

BATISTA JUNIOR, C. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.

BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna/SP: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388 p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; PETRI, J. L.; MARODIN, G. A. B.; Cultivares de fruteiras de Carço. In: MONTEIRO, L. B.; MAY DE MIO, L. L.; SERRAT, B. M. MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de carço: uma visão ecológica**, Curitiba/PR: UFPR, 2004. p. 5-32.

BIENAPFL, J. C.; BALCI, Y. *Phomopsis* Blight: A new disease of *Pieris japonica* caused by *Phomopsis amygdali* in the United States. **Plant Disease**, Maryland, v. 97, n. 11, p. 1403-1407, 2013.

BIOCAMPO. Alga Grow. Disponível em: <http://www.biocampo.com.br/images/produto_images/algagrow.htm>. Acesso em: 19 mai. 2014.

BREMER, K. Major clades and grades of the *Asteraceae*. In: *Compositae: Systematics Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, 1994 (D. J. N. HIND; H. J. BEENTJE, Eds.). **Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 1, p. 1-7, 1996.

CARLIER, J.; CABRITA, L.; LEITAO, J. ISSR and AFLP characterization of *Phomopsis amygdali* (Del.) Tuset & Portilla accessions. **Acta Horticulturae**, Algarve, v. 912, p. 645-651, 2011.

CARREIRA, R. C. **Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Magistra, Cruz das Almas (BA)**. 2007, 191f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo/SP, 2007.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 362-367, 2008.

CARNAÚBA, J. P. et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 199-200, 2007.

CARVALHO, G. A. Seletividade de produtos fitossanitários a parasitoides e predadores. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 4., 2002, Bento Gonçalves. **Anais...**Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002. p. 49-51.

CITADIN, I. **Necessidade de frio, herdabilidade da necessidade de calor e marcadores bioquímicos relacionados com o final de endodormência em pessegueiro**. 2001. 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

CORDOBES, M. A. **Plagas y enfermedades de los frutales Icon hueso**. Andalucía: Consejería de agricultura y pesca, 2004. 104 p.

CRUZ M. C.; SANTOS P. O.; BARBOSA A. M. JR.; DE MÉLO D. L.; ALVIANO C. S.; ANTONIOLLI A. R.; ALVIANO D. S.; TRINDADE R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, São Cristóvão, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007.

DAI, F. M.; ZENG, R.; LU, J. P. First report of twig canker on peach caused by *Phomopsis amygdali* in China. **Plant Disease**, Xangai, v. 96, n. 2, p. 288, 2012.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, Lisboa, v. 44, p. 107-115, 2010.

EDGINGTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo do Pessegueiro. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 4. ISSN 1806-9207. Pelotas/RS. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/CultivodoPessegueiro/cap02.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

EREZ, A., LAVEE, S. The effect of climatic conditions on dormancy development of peach buds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 96, n. 6, p. 711-714, 1971.

FACHINELLO, J. C.; TIBOLA, C. S.; MAY-DE MIO, L. L.; MONTEIRO, L. B. Produção integrada de pêsego (PIP). In: MONTEIRO, L. B.; MAY-DE MIO, L.; SERRAT, B. M.; MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba/PR: UFPR. 2004. p. 363 - 390.

FACHINELLO, J. C.; MAY DE MIO, L. L.; RANGEL, A. Produção Integrada de pêsego. In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO E SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO E COOPERATIVISMO. **Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasília/DF: MAPA/ACS. 2009. p. 779 - 810.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical yearbook 2013 - World food and agriculture. ISBN 978-92-5-107396-4. Rome, 2013. Disponível em: <www.fao.org/publications>. Acesso em: 13 jan. 2014.

FLACH, A.; GREGEL, B.; SIMIONATTO, E.; SILVA, U. F.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F.; LINARES, C. E. B.; ALVES, S. H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Medica**, Santa Maria, v. 68, n. 9, p. 836-838, 2002.

GAMBOA-ANGULO, M. M.; CRISTÓBAL-ALEJO, J.; MEDINA-BAIZABAL, I. L.; CHÍ-ROMERO, F.; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, R.; SIMÁ-POLANCO, P.; MAY-PAT, F. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Yucatan, v. 24, p. 1955-1959, 2008.

GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R. **Doenças do pessegueiro na Região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves/RS: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 13 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 61).

GOMES, F. R. C. **Qualidade da fruta e do solo em pomares de pessegueiro manejados com aveia-preta**. 2003, 84 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel. Pelotas/RS, 2003.

GÓMEZ, M; GIL, J. F. Topical anti-Inflammatory activity of *Calea prunifolia* HBK (*Asteraceae*) in the TPA model of mouse ear inflammation. J. Braz. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 12, p. 2391-2395, 2011.

GRANITI, A. Qualche dato sulla fitotossicità della «fusicoccina A», una tossina prodotta in vitro da *Fusicoccum amygdali* Del. **Phytopathologia Mediterranea**, Bari, v. 3, p. 75-86, 1964.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza/CE, v. 42, n. 2, abr./jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902011000200028 &lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 mai. 2014.

HOFFMANN, A.; BERNARDI, J.; RASEIRA, M. C. B.; SIMONETTO, P. R. Cultivares, In: **Sistema de produção de pêssgo de mesa na região da serra gaúcha**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE: banco de dados 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_%5Banual%5D/2013/pam2013.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF. ISBN 978-85-240-4168-6. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008-2009_aquisicao/pof20082009_aquisicao.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2014.

INÁCIO, M. M., PASCUALI, L. C., ZELA, S. P., PAULA, P. R. Diagnóstico de óleos essenciais, sobre o desenvolvimento de *Phomopsis phaseoli* var. *sojae*, *Fusarium* sp. e

Macrophomina phaseolina. In: 2º Jornada Científica da Unemat. **Resumos...** Barra do Bugres/MT, 2009.

JAYARAMAN, J.; NORRIE, J; PUNJA, Z. K. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, Trinidad e Tobago, v. 23, n. 3, p. 353-361, 2010.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10. ed. São Paulo/SP: Cia Editora Nacional, 1991. 462 p.

LALANCETTE, N.; POLK, D. F. Estimating Yield and Economic Loss from Constriction Canker of Peach. **Plant Disease**, Bridgeton, v. 84, n. 9, p. 941 - 946, 2000.

LALANCETTE, N.; ROBISON, D. M. Seasonal Availability of Inoculum for Constriction Canker of Peach in New Jersey. **Phytopathology**, Bridgeton, v. 91, n. 11. p. 1109 - 1115, 2001.

LALANCETTE, N.; ROBISON, D. M. Effect of fungicides, application timing, and canker removal on incidence and severity of constriction canker of peach. **Plant Disease**. Bridgeton, v. 86, n. 7, p.721 - 728, 2002.

LALANCETTE, N.; ROBISON, D. M; FOSTER, A. Quantitative Models for Describing Temperature and Moisture Effects on Sporulation of *Phomopsis amygdali* on Peach. **Phytopathology**, Bridgeton, v. 93, n. 9, p. 1165 - 1172, 2003.

LANG, G. A; EARLY, J. D.; MARTIN, G. C.; DARNELL, R. L. Endo, para, and ecodomancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 3. p. 371-377, 1987.

LIZZI, Y. et al. L'algue face au Mildiou quel avenir? **Phytoma**, v. 508, p. 29-30, 1998.

LYON, G.D. et al. Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants against infection. **Plant Pathology**, Oxford, v. 44, p. 407-427, 1995.

PORTOCARRERO, M. A.; KOSOSKI, A. R. Alimentos seguros – uma política de governo. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. p. 11-29.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos acadêmicos**, Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAKSIMOVIĆ, Z.; MILENKOVIĆ, M.; VUČIĆEVIĆ, D.; RISTIĆ, M. Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) essential oil. **Central European Journal of Biology**, Belgrado, v. 3, p. 149-154, 2008.

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004.

MARTINS, M.; SARMENTO, D.; OLIVEIRA, M. M.; BATLLE, I. E VARGAS, F. J. Search for molecular markers linked to *Fusicoccum* tolerance in Almond. **Acta Horticulturae**, v. 577, p. 87-90, 2002.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. M. *Fusicoccum* canker in almond orchards - biotechnology tools for early selection of tolerant genotypes. **Nucis Newsletter**, Espanha, v. 12, p. 12-15, 2004.

MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L. R.; GONÇALVES, M. J.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Ageratum conyzoides* from S. Tomé and Príncipe. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 239, n. 17, p. 239-242, 2005.

MARTIUS, C., EICHLER, A.G., URBAN, I. Flora Brasiliensis, v. 6, n. 3. 1895. Disponível em: < <http://www.botanicus.org/page/140211> > Acesso em: 16 abr. 2014.

McLAREN, J.S. Biologically active substances from higher plants: status and future potential. **Pesticides Science**, St. Louis, v. 17, p. 559-78, out. 1986.

MELO, E. de A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, São Cristóvão, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MICHAILIDES, T. J.; THOMIDIS, T. First report of *Phomopsis amygdali* causing fruit rot on peaches in Greece. **Plant Disease**, Davis, v. 90, n. 12, p. 1551, 2006.

MÓGOR, Á.F.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido l-glutâmico e cálcio em feijoeiro. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 431-437, 2008.

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

MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V., MAL, M.; HOUGHTON, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, Londres, v. 14, p. 289-300, 2007.

NAME, L. H.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; Cromeno isolado do óleo essencial das folhas de *Calea hispida*. In: XX SBQ-Sul Sociedade Brasileira de Química da Região Sul, 2013, Lajeado. **Anais...**: Lajeado: Editora Univates, p. 307, 2013.

NASCIMENTO, A. M. do; SALVADOR, M. J.; CANDIDO, R. C.; ALBUQUERQUE, S; OLIVEIRA, D. C. R. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (*Heliantheae*, *Asteraceae*). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Ribeirão Preto, v. 56, n. 5, p. 663-669, 2004.

NAVA, G. A. **Desenvolvimento floral e frutificação de pessegueiros (*Prunus persica* (L.) Bastch) CV. Granada, submetidas a distintas condições térmicas durante o período de pré-floração e floração.** 2007, 175p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS, 2007.

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29. p. 429-432, 2004.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.).** 1991, 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; POLTRONIERI, L. S. Avaliação do óleo de copaíba (*Copaifera* spp) na inibição do crescimento micelial *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 46, p. 53 - 61, 2006.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário.** Piracicaba/SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 1 - 10.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2007.

PINTO. M.; LIRA, W.; UGALDE, H.; PÉREZ, F. Fisiologia de la latência de lãs yemas de vid: hipótesis actuales. Santiago de Chile: Facultad de Ciências Agronómicas, 2012. 16p. Disponível em: <http://agronomia.uchile.cl/extension/serviços_productos/giel/publications>. Acesso em: 20 mai. 2014.

PORTOCARRERO, M. A.; KOSOSKI, A. R. Alimentos seguros uma política de governo. In: ZAMBOLIM, L.; NASSER, L. C. B.; ANDRIGUETO, J. R.; TEIXEIRA, J. M. A.; KOSOSKI, A. R.; FACHINELLO, J. C. **Produção integrada no Brasil: agropecuária**

sustentável e alimentos seguros. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, p. 13-29, 2009.

PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E. Chromenes and benzofurans of the *Asteraceae*, their chemistry and biological significance. **Phytochemistry**, Wiirzburg, v. 22, n. 11, p. 2335-2348, 1983.

PRUSKI, J. F. *Calea brittoniana* and *Calea kristinia*: two new *compositae* from Brazil. **Brittonia**, New York, v. 36, n. 2, p. 98-103, 1984.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (*Rutaceae*) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Annamalai Nagar, v. 13, p. 107-109, 2010.

RASEIRA, M do. C. B.; NAKASU, B.H. Pessegueiro: introdução. In: BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de fruteiras de clima temperado.** Viçosa/MG: UFV, 2002. p. 89-126.

REGIS, M. A. O. **Ensayos de control del chancro de ramas del almendro causado por *Phomopsis amygdali* (delacr.) J.J Tuset & M.T. Portilla.** 2014, 80 p. Disertación (Ingeniería técnica agrícola, especialidad en hortofruticultura y jardinería) – Universidad de Las Islas Baleares. Palma, 2014.

RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS, J. C. dos; MARTINS, J. R.; SCHRIPSEMA, J.; SIQUEIRA, I. R.; POSER, J. L. von.; APEL, M. A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (*Asteraceae*) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: *Ixodidae*). **Veterinary Parasitology**, Porto Alegre, v. 179, p. 195-198, 2011.

RICHARDSON, E. A.; SEELEY, S. D.; WALKER, D. R.; ANDERSON, J. L. M.; ASHCROFT, G. L. Pheno-climatography of spring peach bud development. **Hortscience**, Alexandria, v. 10, n. 3, p. 236-237, 1975.

ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B.; SILVA, E. L.; DINIZ, S. P. S. S.; OLIVEIRA, R. R.; VIDA, J. B. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.

ROMERO, M. A. AND VARGAS, F. J. Contribution à la connaissance de la sensibilité de l'Amandier au *Fusicoccum amygdali* Del. **Options Méditerranéennes**, IAMZ, v. 81, n. 1, p. 143-147, 1981.

SACHS, S. FELICIANO, A. J.; NAKASU, B. H. Raleio. In: **A cultura do pessegueiro**. Embrapa Clima Temperado. Pelotas/RS, 1984. 156p. (Circular Técnica, 10).

SACHS, S.; CAMPOS, A. D. O pessegueiro. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília/DF: EMBRAPA, 1998, 13-19.

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT. S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Saudi Arabia, v. 98, p. 89-93, 2010.

SANTOS, J. M. **Resolução do complexo de espécies de *Phomopsis* e dos seus teleomorfos *Diaporthe* no hospedeiro *Foeniculum vulgare***. 2008. 42p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

SANTOS, P. L. **Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Phomopsis sojae* e a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2014. 51p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas). ESALQ/USP, São Paulo/SP, 2014.

SCARIOTTO, S. **Fenologia e componentes de rendimentos de pessegueiro em condições subtropicais**. 2011, 131p. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal). UTFPR, Pato Branco/PR. 2011.

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

SIEBERTZ, R.; PROKSCH, P.; WITTE, L. Accumulation and biosynthesis of the chromenes precocene I and II in *Ageratum houstonianum*. **Phytochemistry**, Braunschweig, v. 29, n.7, p. 2135-2138, 1990.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

SOUZA JÚNIOR, A. A. **Investigação da origem biossintética de cromenos e cromanos em *Piper aduncum* e *Peperomia obtusifolia* (Piperaceae)**. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2014.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília/DF, n. 11, p. 16-21, 1999.

STROBEL, G.A. Phytotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, Bozeman, v. 51, p. 309-333, 1982.

THOMIDIS, T. MICHAILIDES, T. J. Studies on *Diaporthe eres* as a New Pathogen of Peach Trees in Greece. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1293-1297, 2009a.

THOMIDIS, T. MICHAILIDES, T. J. Contribution of Pathogens to Peach Fruit Rot in Northern Greece and their Sensitivity to Iprodione, Carbendazim, Thiophanate-methyl and Tebuconazole Fungicides. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157. p. 194–200, 2009b.

TITI, A. E. L. et. al. **Producción integrada: principios y directrices técnicas**. Darmstadt: IOBC/ WPRS, 1995. 22p. (IOBC/ WPRS Bulletin, 18).

UDAYANGA, D., LIU, X., MCKENZIE, E. H. C., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A. H. A., AND HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 50, p. 189-225, 2011.

UDDIN, W.; STEVENSON, K. L.; PARDO-SCHULTHEISS, R. A. Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts. **Plant Disease**, Georgia, v. 81. n. 9. p. 983-989, 1997.

TUSET, J. J.; PORTILLA, M. T. Taxonomic status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdalina*. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 67, n. 5, p. 1275-1280, 1989.

VAN ZYL, R. L. et al. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **Journal Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 18, n. 1, p. 129-133, 2006.

VERDU, G. Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que constituyen formas imperfectas (Deuteromicetos) de Ascomicetos. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 12, p. 237-272, 1986.

VIEIRA, S. S., CARDOSO, M. DAS G.; SOUSA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, M. A.; ANDRADE, J. Composição química e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. (Mentrasto). **Magistra**, Cruz das Almas/BA, v. 24, n. 1, p. 55-62, 2012.

WANNES, W. A. et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

ZANANDREA, I. et al. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá/PR, v. 14, p. 14-16, 2004.

ZEHR, E.I. Constriction canker. In OGAWA, J.M., ZEHR, E.I., BIRD, G.W., RITCHIE, D.F., URIU, K. E UYEMOTO, J.K. (eds). **Compendium of stone fruit diseases**, p. 31-32. American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota. 1995.