UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS
***CAMPUS* CERRO LARGO**
CURSO DE AGRONOMIA

PAOLA DAIANE WELTER

POTENCIAL DE CONTROLE *in vitro* DE FUNGOS E NEMATÓIDE, ISOLADOS DO MORANGO, POR EXTRATOS DE *Calendula officinalis* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

CERRO LARGO – RS
2015

PAOLA DAIANE WELTER

POTENCIAL DE CONTROLE *in vitro* DE FUNGOS E NEMATÓIDE, ISOLADOS DO MORANGO, POR EXTRATOS DE *Calendula officinalis* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia dà Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador (a). Dr (a). Juliane Ludwig
Coorientador (a). Dr (a). Tatiane Chassot.

CERRO LARGO - RS

2015

DGI/DGCI - Divisão de Gestao de Conhecimento e Inovação

Welter, Paola Daiane
POTENCIAL DE CONTROLE in vitro DE FUNGOS E NEMATÓIDE, ISOLADOS DO MORANGO, POR EXTRATOS DE Calendula officinalis EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES/ Paola Daiane Welter. -- 2015.
44 f.

Orientadora: Juliane Ludwig.
Co-orientadora: Tatiane Chassot.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia , Cerro Largo, RS, 2015.

1. Controle alternativo. 2. Efeito fungicida e nematicida. 3. Extratos vegetais. I. Ludwig, Juliane, orient. II. Chassot, Tatiane, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PAOLA DAIANE WELTER

POTENCIAL DE CONTROLE *in vitro* DE FUNGOS E NEMATÓIDE, ISOLADOS DO MORANGO, POR EXTRATOS DE *Calendula officinalis* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para a obtenção de grau Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul

Orientador (a). Dr (a). Juliane Ludwig

Coorientador (a). Dr (a). Tatiane Chassot.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em 23/11/2015.

BANCA EXAMINADORA

Juliane Ludwig
Prof (a). Dr (a). Juliane Ludwig – UFFS

Tatiane Chassot
Prof (a). Dr (a). Tatiane Chassot – UFFS

Prof (a). Dr (a). Fernanda San Martins Sanez - UFFS

Dedico a minha mãe Rosemari Maria Utzig Welter, pelo apoio, assistência e por todo esforço despendido para tornar tudo isso possível. Ao meu pai, Paulo Roberto Welter, minha grande inspiração, por confiar em mim, por garantir a realização desse sonho, para o qual faço do meu sonho o nosso. Aos meus irmãos, Natan Roberto Welter e Nicoly Welter e demais

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me abençoar durante essa caminhada, por me manter forte e centrada para que eu perseverasse sempre.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, por tornarem possível a realização desse sonho e por confiarem e terem fé no meu potencial.

A Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Cerro Largo pela oportunidade de realizar esse projeto, pelo espaço físico a mim concedido. Aos docentes pelos ensinamentos a mim transmitidos.

A minha orientadora Dr (a). Juliane Ludwig, por confiar no meu trabalho, pela amizade, pelo apoio e orientação.

A minha coorientadora Dr (a). Tatiane Chassot, pelos ensinamentos, pelas inúmeras contribuições e pela amizade.

Ao Pesquisador da Embrapa Clima Temperado César Bauer, por disponibilizar o espaço físico e material para que eu conseguisse dar continuação aos meus experimentos.

As amizades sinceras que adquiri durante essa caminhada e em especial a aquelas que de certa forma contribuíram e me ajudaram nesse projeto: Cristian Troyjack, pelo apoio, amizade e conselhos a mim dados, a Carol Elisa Becker, pela ajuda em algumas etapas do experimento e avaliações, ao Anderson Pavanelo, por se mostrar sempre tão disposto quando necessário algum auxílio, ao Jeferson Tonin, pelas conversas e ideias a mim repassadas.

Aos demais professores, Renan, Luren e Mardiore e ao engenheiro agrônomo Odair pela concessão de equipamentos e materiais necessários a execução desse trabalho.

Meu muito obrigada à todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte dessa grande conquista!!

“” A força não vem da vitória. Seus esforços desenvolvem suas forças. Quando você enfrenta dificuldades e decide não se entregar, isso é força!”” (SCHWARZENEGGER).

RESUMO

O morango, *Fragaria x ananassa* Duch., devido a sua perecibilidade vem recebendo uma alta carga de produtos químicos e sintéticos, fazendo crescer o número de pesquisas relacionadas ao uso de produtos alternativos na cultura. A calêndula, conhecida pelo seu potencial terapêutico, vem sendo testada no meio agrícola com o intuito de apurar seu potencial de proteção a agentes fitopatogênicos que possam atacar as culturas agrícolas. Devido ao pequeno número de estudos envolvendo o uso da calêndula na agricultura, o presente trabalho objetivou apurar, *in vitro*, o potencial fungicida frente a *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea* bem como o nematicida em *Meloidogyne hapla*. Para tanto, foram preparados, separadamente, os extratos brutos aquosos foliar (EBAFO) e de capítulos (EBACA) da calêndula, ambos a 10%. No ensaio que avaliou a atividade fungicida, as concentrações de 0% (testemunha); 1,25%; 2,5%; 5% e 10% do EBAFO e do EBACA foram misturados, individualmente, ao meio de cultura BDA (batata dextrose agar) fundente. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições. Avaliou-se o crescimento micelial dos fungos até um dos tratamentos ter alcançado o bordo da placa, quando também se avaliou a esporulação em câmara de Newbauer. Para a avaliação do potencial nematicida, utilizou-se as concentrações de 0% (testemunha); 6,25%; 12,5%; 25% e 50% com o mesmo delineamento, onde após a obtenção dos ovos, estes foram dispostos em placas de microtitulação (tipo ELISA) e a eclosão avaliada aos 12 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância com o auxílio do software estatístico SASM – Agri e as médias submetidas à análise de regressão com o auxílio da Planilha Eletrônica Excel, onde foram analisadas as variáveis: extrato/crescimento micelial; extrato/esporulação extrato/eclosão. Os resultados obtidos demonstram que o EBACA tem ação inibitória sobre o fungo *B. cinerea*, para o qual as concentrações de 5% e 10% foram as que mais inibiram o crescimento micelial em relação à testemunha. No ensaio com o EBAFO, os tratamentos estimularam o crescimento micelial em relação a testemunha. Frente ao fungo *C. acutatum*, não foi observado efeito fungistático de nenhuma das concentrações de ambos os extratos testados, e sim, um efeito estimulante gradativo na maioria dos tratamentos em comparação a testemunha, com diferença chegando a 1,4 cm com a aplicação do extrato de capítulos e 4,2 cm para o foliar. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, quando foi avaliada esporulação de ambos os patógenos. As diferentes concentrações dos extratos oriundo dos capítulos e folhas de C. *officinalis* exerceram efeito significativo sobre a eclosão de J2 em relação à testemunha, sendo possível observar uma redução na porcentagem de eclosão em relação à testemunha já na dose mais baixa do extrato (6,25%).

Palavras chaves: Calêndula. *Fragaria x ananassa* Duch. *Colletotrichum acutatum. Botrytis cinerea*. *Meloidogyne hapla*.

ABSTRACT

The strawberry, *Fragaria* x *ananassa* Duch., due to its high perishability comes receiving a high load of chemical and synthetic products, increasing the number of researches related with the use of alternative products in the cultivation. The calendula, known for its therapeutic potential, is being tested in the agricultural environment with the intention of determining its potential to protect the phytopathogenic agents that could attack agricultural crops. Due to the small number of studies involving the use of calendula in agriculture, the present study aimed to investigate, in vitro, the fungicidal potential against *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* as well as the nematicides potential on *Meloidogyne hapla*. To do so, were prepared, separately, the aqueous crude roister extract (EBAFO) and chapters (EBACA) of calendula, both 10%. In the trial that assessed the fungicidal activity, the concentrations of 0% (control); 1,25%; 2,5%; 5% and 10% of EBAFO and EBACA, were mixed, individually, in the middle of PDA (potato dextrose agar) flux cultivation. The experimental design used was completely randomized (CRD), with 5 treatments and 4 repetitions. It was evaluated the mycelial growth of fungi until one of the treatments have reached the edge of the plate, when was also evaluated the sporulation in the Newbauer chamber. For the evaluation of the nematicide potential, were used the concentrations of 0% (control); 6,25%; 12,5%; 25% and 50% with the same design, where after obtaining the eggs, they were placed in microtiter plates (ELISA type), and the outbreak was evaluated at 12 days. The data were submitted to analysis of variance with the help of the statistical software SASM – Agri and averages submitted to regression analysis with the help of the Excel Spreadsheet, where the following variables were analyzed: extract/mycelial growth; sporulation/extract; extract/outbreak. The results obtained demonstrate that the EBACA has an inhibitory effect on the fungus *B. cinerea*, for which the concentration of 5% and 10% were the most inhibited in the mycelial growth compared to the control. In the trial with EBAFO, the treatments stimulated the mycelial growth compared to the control. In front of the fungus *C. acutatum*, fungistatic effect was not observed in any of the concentrations of both extracts tested, but rather a gradual stimulating effect in most of the treatments compared to the control, with the difference reaching 1,4 cm with the implementation of the extract of chapters and 4,2 cm for the roister. There was no significant difference among the treatments, when was evaluated the sporulation of both pathogens. Different concentrations of the extracts derived from the chapters and leaves of *C. officinalis* exerted a significant effect on the outbreak of J2 in relation to the control, being possible to observe a reduction in the percentage of the outbreak compared with the control already in the lowest dose of the extract (6,25%).

Key words: Calendula. *Fragaria x ananassa* Duch. *Colletotrichum acutatum*. *Botrytis cinerea*. *Meloidogyne hapla*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 CULTURA DO MORANGUEIRO 12
2.2 EXTRATOS NATURAIS 18
2.3 CALÊNDULA (*Calendula officinalis*) 20
3 MATERIAIS E MÉTODOS 22
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO 22
3.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS DOS FUNGOS 22
3.3 OBTENÇÃO DOS OVOS DE NEMATÓIDE 22
3.4 FORMULAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS 23
3.5 CONDUÇÃO DOS ENSAIOS 23
3.6 AVALIAÇÕES 25
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
4.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DA ESPORULAÇÃO 26
4.2 INIBIÇÃO DA ECLOSÃO DE JUVENIS DE ESTÁGIO 2 34
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de morango (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) possui grande expressão nacional, no qual o Rio Grande do Sul é responsável por grande parte dessa produção. É uma hortaliça que possui grande apreço na mesa do consumidor, devido sua coloração, sabor, aroma, além das propriedades nutricionais contidas no fruto. Para seu cultivo, necessita de grande aporte de mão-de-obra devido aos cuidados constantes por ser uma cultura com alto grau de perecibilidade, e também, é alvo de cobranças em se tratando de segurança alimentar (COCCO et al., 2011).

A cultura do morangueiro, tanto em sua fase vegetativa e especialmente nas fases reprodutiva e de pós-colheita, é acometida por diversas doenças, principalmente as de caráter fúngico, onde uma gama de patógenos consegue penetrar facilmente devido à sensibilidade característica do fruto (MAZARO et al., 2008a).

Dentre as diversas injúrias causadas por fungos, temos a antracnose, conhecida também como "flor preta", causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum,* que quando penetra na flor ou no fruto causa graves lesões necróticas, tornando os frutos mumificados, comprometendo o desenvolvimento destes e consequentemente a produção (UENO, 1996). Outra doença de grande importância na cultura e que acomete os frutos a campo e com maior freqüência na pós-colheita é o mofo cinzento, resultado da infecção pelo fungo *Botrytis cinerea,* que possui como sintoma característico uma massa de micélio cinzenta, responsável por causar podridões e posterior perda da produção (COSTA; VENTURA; LOPES, 2011). Além dos fungos, há também as doenças causadas por nematóides que atacam o morangueiro produzindo galhas, que interferem significativamente no desenvolvimento da planta e por seguinte na produtividade da cultura (GOMES e COFCEWICZ, 2005).

Devido à sensibilidade do morango e o potencial de danos dos patógenos, o uso de substâncias químicas e sintéticas para o controle de doenças torna-se excessivo na cultura. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do ano de 2012, o morango destacou-se como uma das hortaliças com o maior índice de resíduos de agrotóxicos bem como quanto à presença de um maior número de amostras com resíduos de substâncias de uso não autorizado na cultura (ANVISA, 2013).

Diante deste cenário, cresce a necessidade do avanço de pesquisas visando o manejo eficiente de doenças no morangueiro, utilizando matérias-primas naturais para a confecção de extratos. Autores como Portocarrero e Kososki (2009), destacam a preocupação da população em relação à segurança alimentar, onde a sociedade preza por alimentos mais naturais e

saudáveis, com menor incidência de agrotóxicos e consequentemente menor teor de resíduos químicos.

Esse controle, citado como alternativo, se utiliza de produtos extraídos de fontes naturais, como flores, folhas entre outros, os quais não oferecem riscos à saúde humana, ao meio ambiente e aos animais que nele vivem. Produtos, na maioria das vezes, de fácil acesso, podendo ser adquiridos na própria propriedade, no caso de pequenos agricultores ou agricultores familiares (CARNEIRO et al., 2007).

A Calêndula (*Calendula officinalis*) é um exemplo de planta que pode ter esse potencial. De ocorrência cosmopolita, comum em locais de clima temperado, tropical, de baixa umidade relativa e abertos, pertence à família das Asteraceae (Compositae) (BORBA, 2010). É utilizada comumente de forma ornamental, conhecida por suas propriedades medicinais atribuídas as diversas substâncias produzidas pela mesma sendo uma das plantas medicinais com maior espectro de uso em diferentes áreas (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012). A partir de seus capítulos secos pode ser fabricado um extrato com potencial de uso na agricultura, pois pode ser utilizado no combate de pragas e doenças agrícolas, como é o caso do estudo realizado por Fogolari (2010), onde se averiguou o potencial do extrato de *C. officinalis* na indução de resistência e potencial fungistático sobre fungo da espécie *B. cinerea.*

Diante desse potencial demonstrado pela calêndula e da necessidade de pesquisas utilizando produtos que ofereçam menos riscos aos consumidores, o presente trabalho objetivou verificar o potencial de diferentes concentrações do extrato produzido a partir das folhas e capítulos de *C. officinalis* frente aos fungos *C. acutatum* e *B. cinerea*, e ao nematóide *Meloidogyne hapla*, em ensaios realizados *in vitro.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO MORANGUEIRO

2.1.1 Características históricas do morangueiro

Pertencente ao gênero *Fragaria* da família Rosacea, o morangueiro tem sua origem conhecida através de antigos registros de sua produção datados do século XV oriundos de países da Europa. O morangueiro cultivado atualmente é tido como um híbrido (*Fragaria* x *ananassa* Duschene) desenvolvido na Europa, resultante do cruzamento entre espécies americanas e européias (SANHUEZA et al., 2005).

No Brasil, o início do seu cultivo, é pouco conhecido. O que se sabe, é que em determinada época, por volta do século XX, a cultura sofreu uma grande expansão através de incentivos (CAMARGO e PASSOS, 1993 apud SILVA, 2011), difundindo-se principalmente nos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul (AMARO, 2002). A partir da década de 60, verificou-se o lançamento de cultivares nacionais desenvolvidas pela Embrapa Clima Temperado unidade de Pelotas, o que alavancou ainda mais o seu cultivo (CONTI; MINAMI; TAVARES, 2002).

O morango é altamente apreciado devido suas características de cor, sabor, aroma e qualidades nutricionais, agradando o paladar de diversos consumidores pelo mundo. Apresenta alta adaptabilidade nas diversas regiões brasileiras, o que possibilita sua difusão tanto em regiões de clima temperado quando de clima tropical (COCCO et al., 2011). Tal característica agregou à cultura tanto valores econômicos, pela fácil movimentação no mercado, quanto sociais, pois devido à mão-de-obra necessária para seu cultivo e pela possibilidade do cultivo do fruto em pequenas extensões de terra, agradou principalmente os produtores familiares (VAILATI e SALLES, 2010; SPECHT e BLUME, 2009; AMARO, 2002; REISSER JUNIOR et al., 2008).

Apesar da sua adaptabilidade, o que se observa é que as diferentes cultivares de morango respondem de forma diferente em cada região, sendo essas respostas altamente dependentes de fatores meteorológicos e do tipo de manejo utilizado. Tais características, segundo Ueno (2004 apud ANTUNES et al., 2006), resultam em melhor desenvolvimento de determinadas cultivares em uma região e de outras cultivares em outras regiões.

2.1.2 Características morfológicas do morangueiro

O morangueiro é uma planta herbácea, pertencente ao grupo das hortaliças (FILGUEIRA, 2008). É conhecido pelo seu porte baixo e por constituir touceiras. Sua principal forma de propagação se dá a partir de estolões, estrutura vegetal constituída de um caule que tem seu crescimento rente ao solo, sendo este desenvolvido pela própria planta. O estolão apresenta, no seu decorrer, gemas ou nós que dão origem às raízes que se fixam ao solo, formando uma nova planta. Esse prolongamento de tecido meristemático tem sua origem nas axilas das folhas trifolioladas do morangueiro (CAMARGO; SCARANARI; IGUE, 1974).

O sistema radicular do morangueiro é do tipo fasciculado e superficial (FILGUEIRA, 2008). É composto por raízes primárias, responsáveis por uma maior absorção, reserva de nutrientes e de água e podem alcançar maiores profundidades, e secundárias, que são raízes menos desenvolvidas e responsáveis pela absorção de nutrientes nas camadas mais superficiais do solo (PIRES et al., 2000).

É de uma estrutura denominada coroa que se originam as folhas, as quais podem apresentar características distintas quanto a cultivar. As folhas são geralmente trifolioladas, com ou sem presença de um par de folíolos logo abaixo do trifólio. O grande número de estômatos nas folhas, cerca de 300 a 400 por mm^2, torna essa cultura muito suscetível a déficits hídricos, altas temperaturas, umidade relativa do ar, alta intensidade luminosa dentre outros fatores (SANHUEZA et al., 2005).

A inflorescência do morangueiro constitui-se de cimeiras, que crescem a partir de gemas localizadas nas axilas das folhas, podendo dar origem tanto a flores perfeitas (bissexuadas) ou imperfeitas (unissexuadas), sendo nesta última necessário a realização de polinização cruzada entre as flores de diferente sexo (BRAZANTI, 1989 apud SILVA, 2011). A partir disso, forma-se o fruto do morangueiro, que na verdade é um pseudofruto originário de um receptáculo carnoso, no qual estão inseridos os verdadeiros frutos, denominados de aquênios e popularmente são conhecidos como as “sementes do morango” (SANHUEZA et al., 2005). Comumente é das primeiras inflorescências que resultam os frutos de maior tamanho diminuindo gradativamente no decorrer das novas florações (FILGUEIRA, 2008).

2.1.3 Cadeia produtiva do morango

A cadeia produtiva do morango tem grande expressão em vários países do mundo e, localmente, devido a sua produção mobilizar desde pequenos até grandes produtores (SPECHT e BLUME, 2009). Segundos dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) de 2012, o maior produtor mundial dessa fruta é os Estados Unidos, seguido pelo México e posteriormente pela Turquia (FAO, 2012). Segundo Antunes e Reisser Junior (2007), a produção mundial aumentou 29% entre os anos de 1997 a 2006, aumentando também a área plantada em 18%, nesse mesmo período.

Em se tratando de Brasil, vem crescendo a importância social da cultura e, com o surgimento e desenvolvimento de novas técnicas, a produção vem sendo favorecida significativamente além da possibilidade do oferecimento de frutos com melhor qualidade. No mercado nacional, cerca de 90% da produção é destinada para consumo in natura e o restante para a indústria (ANTUNES e REISSER JUNIOR, 2007). Essas informações divergem das trazidas por Madail et al. (2007), o qual afirma que no Brasil, 70% da produção comercializada é na forma in natura, sendo que os 30% restantes passam por algum tipo de processamento antes de serem comercializados.

Segundos dados do Censo Agropecuário realizado pelo IBGE (2006), dentre os estados brasileiros, os que detêm maior produção com a cultura são respectivamente os estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, acredita-se que a área cultivada com o fruto já ultrapasse os 4.000 hectares, divididos em grande maioria, em pequenas propriedades familiares (MADAIL et al., 2009). De acordo com Antunes e Reisser Junior (2007), a possibilidade de cultivo em diferentes estados do país devido às características distintas das cultivares, beneficia a produção comercial da fruta.

No estado do Rio Grande do Sul, a cultura é produzida, em sua maioria, em pequenas propriedades familiares, uma vez que demanda grande contingente de mão-de-obra devido ao fato de necessitar um manejo cuidadoso, pois se trata de uma cultura com alta perecibilidade e alvo de políticas de segurança alimentar em função da grande quantidade de agrotóxicos aplicados no cultivo convencional (SPECHT e BLUME, 2009).

Nesse contexto, o morangueiro se caracteriza como uma cultura que visa fortalecer as políticas de Produção Integrada – PI, com ações que promovam a certificação dos produtos, garantindo a qualidade do produto a ser comercializado, respeitando ao meio ambiente e garantindo uma melhor posição de venda (ANTUNES e REISSER JUNIOR, 2007).

2.1.4 Doenças em morangueiro

Devido à suscetibilidade da planta e a sensibilidade do fruto, o morangueiro é comumente atingido por diversas doenças tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva bem como na pós-colheita. Essas injúrias podem ser causadas por diversos agentes, desde fungos, com maior frequência, nematóides, bactérias e vírus (KIMATI et al., 1997).

Devido à grande umidade acumulada nas plantas nas horas iniciais do dia e durante a noite, assim como a umidade contida no fruto, as chances de desenvolvimento de patógenos aumentam ainda mais se somadas com índices mais elevados de temperatura. As formas de manejo e a cultivar utilizada também podem agravar ou auxiliar no controle de determinadas doenças. Devido a esses fatores, meios de controle e manejos alternativos são desenvolvidos com o intuito de manter a importância econômica, social e ambiental da cultura (ANTUNES et al., 2007).

2.1.4.1 Antracnose em morangueiro

Popularmente conhecida como “flor preta”, a antracnose do morangueiro causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, teve seu primeiro relato na Austrália (SIMMONDS, 1965 apud UENO, 1996). No Brasil, apenas em 1992 o fungo foi precisamente identificado e sua presença detectada nos estados de São Paulo e no Distrito Federal, onde neste último acreditou-se que a contaminação ocorreu devido à introdução de mudas infectadas vindas do estado de São Paulo, já que as condições e a suscetibilidade da cultivar eram propicias ao desenvolvimento do agente causal da doença (UENO, 1996).

O fungo *C. acutatum*, é considerado bastante agressivo no ataque de frutos e flores. A doença associada ao fungo recebe esse nome, pois o fungo ataca as flores em todos os estágios de formação, tornando os pistilos e os estames necrosados com coloração escura. A infecção normalmente inicia no pedúnculo, necrosando posteriormente cálice, botões e flores, podendo atingir toda a inflorescência em cultivares mais suscetíveis, causando uma podridão seca, com a aparência de uma flor queimada (Fig.1B). Nos frutos, *C. acutatum* pode lesionar qualquer parte deste, sendo que em períodos de maior umidade consegue-se observar massas rosadas que nada mais são que os esporos do fungo (Fig.1A). Nos folíolos também pode se observar lesões em forma de manchas escuras, iniciando seu crescimento nos bordos e avançando, no decorrer do desenvolvimento, para o centro (KIMATI et al., 1997).

Figura 1 – Sintoma característico de antracnose em morango (A). Flores com aspectos de podridão seca (flor queimada), sintoma causado pela doença (B).

Fonte: Gerald Holmes, North Carolina, United States.

Fonte: R.J.Domingues, São Paulo.

O patógeno é introduzido por mudas contaminadas, sendo que sua sobrevivência se dá em restos culturais e a disseminação ocorre pela água da chuva e por aspersão no canteiro, favorecida pela cobertura plástica do mesmo (DIAS-ARIEIRA et al., 2010). Os períodos de floração e frutificação são os mais suscetíveis, pois geralmente são favorecidos pela mesma condição que também é a ideal para o desenvolvimento do patógeno (LEANDRO et al., 2001).

O controle dessa doença é relativamente difícil, principalmente porque cultivares amplamente utilizadas, como a Camarosa, são extremamente suscetíveis, além do mais os fungicidas recomendados tem baixa eficiência a campo e frequentemente são relatados casos de resistência, restando a utilização de mudas sadias como fator decisivo para evitar a manifestação da doença (COSTA, VENTURA e LOPES, 2011)

2.1.4.2 Mofo cinzento em morango

O mofo cinzento tem como agente causal o fungo *Botrytis cinerea*, responsável por infectar frutos, ocorrendo de maneira generalizada, principalmente em pós-colheita (REIS e COSTA, 2011). No entanto, a infecção pode ocorrer ainda nas pétalas senescentes para posteriormente infectar os tecidos saudáveis do fruto, sendo que em frutos verdes podem aparecer pequenas lesões marrons levemente depressivas (TÖFOLI et al., 2011).

Na maioria das vezes as infecções permanecem latentes e os sintomas se manifestam somente no início do amadurecimento dos frutos que se apresentam com manchas marrons claras (Fig.2A), não aquosas, que evoluem tomando todo o corpo do fruto assumindo, então,

um aspecto seco, firme e acinzentado devido às estruturas do fungo que o recobrem (Fig.1B) (KIMATI et al., 1997).

Figura 2 – Sintomas de mofo cinzento em pseudofruto do morangueiro (A). Frutos com aspecto seco, em estágio avançado da doença (B).

Fonte: Scott Bauer, United States.

Fonte: Scott Bauer, United States.

O fungo infecta várias outras culturas e sua disseminação em curtas distâncias se dá através dos restos de culturas e pelo vento ou respingos de chuva (BRAGA, 2012). Segundo esse mesmo autor, as pulverizações com fungicidas, duas a três aplicações durante o estágio de floração, devem ocorrer de forma preventiva, mas apenas o seu uso não tem sido eficiente para prevenir o aparecimento de epidemias.

2.1.4.3 Nematóides em morangueiro

Outra causa de grandes perdas na produção de morangos, são as doenças causadas por nematóides, os quais podem ser do tipo ectoparasita ou endoparasita. Os endoparasitas se estabelecem no interior da planta se locomovendo pelo cilindro central, estabelecendo uma região de alimentação, permanecendo por toda a vida, ou ainda locomovendo-se pelos tecidos das plantas esgotando parte de suas reservas nutricionais até o final do seu ciclo, o que confere um prejuízo no desenvolvimento dos frutos. Já os ectoparasitas, se alimentam de nutrientes presentes na superfície das raízes, causando também prejuízo nutricional as plantas. Dentro as espécies de nematóides que atacam a cultura do morangueiro há três de maior ocorrência no Brasil, sendo eles: *Aphelenchoides besseyi*, *Aphelenchoides fragariae* e *Meloidogyne hapla* (GOMES e COFCEWICZ, 2005).

Ainda segundo Gomes e Cofcewicz (2005), para se evitar a infestação por nematóides é imprescindível a utilização de mudas certificadas de morangueiro e de substrato estéril, se cultivado em estufas. Quanto ao cultivo em solo, é de suma importância realizar rotação de culturas na área, principalmente em casos de nematóides das galhas do gênero *Meloidogyne sp*.

2.2 EXTRATOS NATURAIS

Segundo Bettiol e Morandi (2009), o uso excessivo de substâncias químicas no controle de pragas e doenças vem desencadeando mundialmente uma série de problemas dentre os quais podemos citar a contaminação de solos, águas e principalmente dos alimentos, intoxicação de agricultores, desequilíbrio biológico, morte de organismos benéficos, doenças causadas pelos agrotóxicos (iatrogênicas), redução da biodiversidade, entre outros. Aliado a isso, há a facilidade de obtenção destes produtos, assim como a forma de usá-los, onde não é preciso um entendimento amplo sobre o ecossistema, fazendo com que o produtor opte por utilizá-los, agravando ainda mais a situação. No entanto, de acordo com os mesmos autores, o cenário mundial de consumo está sofrendo mudanças, a sociedade preza por alimentos mais saudáveis e sem resíduos químicos, exige certificação de que os produtos a serem consumidos estejam isentos de agrotóxicos ou que o uso destes tenha sido de acordo com as normas específicas.

Com isso, a utilização de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de pragas e doenças vêm ganhando espaço, no intuito de proporcionar um cultivo mais sustentável e menos dependente de agrotóxicos.

Esta visão muda as perspectivas do sistema agrícola, em se tratando do uso de energias não renováveis, trazendo um novo conceito entre os níveis de produção e impactos ambientais, portanto, ao diminuirmos o uso de produtos químicos e insumos energéticos, se opta por processos mais alternativos (BETTIOL e GHINI, 2003), dentre esses se encontram os extratos obtidos de plantas. Os extratos vegetais possuem uma grande vantagem em relação aos produtos sintéticos, devido aos organismos patogênicos não reconhecerem seu principio ativo e consequentemente não conseguirem inativá-lo e também, pela capacidade destes compostos de se degradarem rapidamente, além de serem oriundos de matéria-prima natural e renovável (FERRAZ et al., 2008).

Vários trabalhos já foram desenvolvidos e demonstram o potencial fungicida de diversas plantas medicinais, tanto pela inibição do crescimento micelial e esporulação dos

fungos, quanto pela indução de defesa na planta, acumulando, por exemplo, fitoalexinas (metabólitos secundários), e, sinalizando a presença de moléculas de defesa (BONALDO et al., 2004).

2.2.1 Extratos naturais na cultura do morango

O morangueiro, conforme relatado anteriormente, apresenta grande suscetibilidade a ataques de microorganismos fitopatogênicos que acabam por causar perdas tanto em pré como em pós-colheita, podendo, em função das características do patógeno, da ocorrência de condições ambientais favoráveis e do grau de suscetibilidade da cultivar, causar perda total da lavoura e, consequentemente, da produção (DIAS-ARIEIRA et al., 2010).

No cultivo convencional, tem-se ainda como principal meio de controlar essas doenças o uso de insumos químicos. Segundo o AGROFIT (2015), para controle de fitopatógenos na cultura do morangueiro estão registrados cerca de oito ingredientes ativos, comercializados com diversos nomes. Porém, segundo pesquisa realizada por Kososki et al. (2001), na qual foram avaliados 11 diferentes fungicidas no combate ao fungo *Colletotrichum acutatum* em morangueiro, não foi observada ação satisfatória sobre o fungo em nenhum dos tratamentos testados, comprovando-se que a eficácia dos fungicidas convencionais é um entrave na cultura além da falta de produtos recomendados, dependendo da doença.

Além do disposto acima, segundo dados da ANVISA do ano de 2012, o morango apresentou índices elevados de resíduos, inclusive acima do limite máximo autorizado. De 13 amostras testadas, 6% estavam nestas condições, de 80 amostras testadas, 38% apresentaram ingredientes ativos não autorizados e de outras 32 amostras, 15% apresentaram as duas condições descritas (ANVISA, 2013).

Na tentativa de sanar esses problemas advindos das doenças, da ineficiência e dos riscos do controle químico, várias pesquisas com extratos vegetais vêm mostrando resultados positivos sobre fungos que atacam a cultura do morango, tanto pela ação fungicida como pela inibição do crescimento micelial, esporulação dos fungos e também pela indução de resistência por parte da planta. Dentre os extratos mais testados em *Fragaria sp.*e que obtiveram melhores resultados, tem-se os extratos oriundos de pitangueira (*Eugenia uniflora)* (MAZARO et al., 2008b), calêndula (*Calendula officinalis*) (FOGOLARI, 2010) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (SILVA et al., 2008). Segundo Dotto et al. (2014), trabalhos utilizando essa alternativa de controle ainda pecam na falta de informações para o uso destes pelos agricultores.

2.3 CALÊNDULA *(Calendula officinalis)*

Pertencente a família das Compositae (Asteracea), a calêndula (*C. officinalis*) é uma planta anual (LORENZI, 2008), de origem Mediterrânea, tendo seu principal uso na cicatrização de tecido cutâneo e no tratamento de abscessos e inflamações (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002). A planta desenvolve-se bem em condições de luz plena e a época de colheita começa cerca de dois meses após o plantio podendo se estender por mais 2 ou 3 meses, sendo capaz de alcançar uma produtividade média de 720Kg ha^{-1} de flores secas. Prefere áreas com boa drenagem e com um adequado teor de matéria orgânica no solo (MARTINS et al., 2000 apud FOGOLARI et al., 2010).

Altamente adaptada ao sul do Brasil, devido às condições edafoclimáticas favorecer seu cultivo, se torna uma boa alternativa de renda para agricultores familiares uma vez que o beneficiamento da cultura ainda é realizado com trabalho manual devido à escassez de maquinário, sendo este o principal entrave do cultivo desta flor em larga escala (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002).

2.3.1 Características morfológicas da *C. officinalis*

Também conhecida como malmequer e maravilha-do-jardim, a calêndula é uma planta herbácea, atinge cerca de 40 a 60 cm de altura, possui folhas grossas e ovaladas, conhecida por suas pequenas flores reunidas em capítulos, podendo atingir coloração na faixa do amarelo ao alaranjado. Sua multiplicação é realizada a partir de sementes que devido a sua resistência ao inverno são semeadas normalmente no outono para que floresçam durante o inverno e primavera (LORENZI, 2008).

2.3.2 Propriedades da calêndula

A calêndula possui registro no rol de plantas medicinais, segundo resolução – RE nº 89. de 16 de março de 2004, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2004).

Segundo Silva Junior et al. (2006 apud BORBA, 2010), a *C. officinalis* possui uma rica composição química, incluindo óleo essencial, triterpenos, flavonóides entre outras, responsáveis pela ação cicatrizante, antisséptica, antiflamatória, dentre outras propriedades

biológicas exercidas por esta. Pode ainda exercer propriedades antioxidantes (CETOKVIC et al., 2004).

Estes potenciais possibilitam sua utilização na agricultura devido à produção de fitoalexinas, metabólitos secundários responsáveis por sinalizar moléculas de defesa e consequentemente ativarem rotas de defesa pela planta (DOTTO et al., 2014).

2.3.3 Extrato de *C. officinalis* em morangueiro

Ainda são poucos os trabalhos referentes ao uso de extratos de calêndula em morangueiro, porém, dentre os estudos já realizados, a maioria dos resultados obtidos foram positivos para o controle de fitopatógenos da cultura.

Como exemplo destes trabalhos têm-se a pesquisa realizada por Mazaro et al. (2013), onde foi testado o potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *B. cinerea*, *in vitro*. Nesse caso, o extrato apresentou respostas positivas quanto à inibição do crescimento do respectivo fungo em pós-colheita.

Um exemplo de insucesso no controle do fungo com uso de calêndula foi realizado por Dotto et al. (2014), no qual foi testado a aplicação em pré-colheita de extratos vegetais em morangueiro. O experimento foi realizado com três tipos de extratos, sendo um deles oriundo de *C. officinalis* sobre o fungo *B. cinerea*, neste estudo não se obteve resultados significativos no controle do respectivo fungo, porém, os autores afirmaram que o resultado poderia ser diferente com a modificação das condições de cultivo.

Devido ao potencial da *C. officinalis* ainda pouco conhecido no meio agrícola e a carência de trabalhos com a espécie, o desenvolvimento de trabalhos utilizando como modelo o uso dessa planta, servem para difundir a importância do uso de produtos alternativos para o controle de doenças de importância econômica participando do desenvolvimento e da busca pela sustentabilidade do cultivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

Parte do experimento foi executada no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo – RS. No referido local, foram realizados os ensaios para verificar o potencial antifúngico do extrato de calêndula.

Outra parte foi executada no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS. Neste, realizou-se os ensaios envolvidos na observação da atividade nematicida da calêndula.

3.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA E OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS DOS FUNGOS

Foi utilizado o meio de cultura BDA (batata dextrose agar) (Himedia®), dissolvido em água destilada, previamente fundido em forno microondas e esterilizado em autoclave com pressão de 1,5 atm por 20 minutos.

Para a obtenção das colônias fúngicas, *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea* foram repicados de colônias já estabelecidas provindas de exemplares disponibilizados pela Embrapa Clima Temperado e pela Coleção de culturas Maria de Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, respectivamente. Para tanto, sete dias antes da implantação do experimento, discos de micélio foram dispostos no centro das placas de Petri, as quais após, permaneceram em câmara climática, tipo BOD, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22 ± 2° C.

3.3 OBTENÇÃO DOS OVOS DE NEMATÓIDE

A população de nematoide *Meloidogyne hapla* utilizada no experimento foi disponibilizada pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas, a partir de plantas de tomateiro com galhas já desenvolvidas. Destas foram retiradas massas de ovos com o auxílio de um estilete e depositadas em um tubo com 5 mL de água. Posteriormente, as massas foram transferidas para um Erlenmeyer contendo solução de NaClO a 0,5% e então, agitadas manualmente por 4 minutos e vertidas em peneira de 500 Mesh. Os ovos retidos foram

lavados várias vezes com água destilada e recolhidos em placa de Petri com aproximadamente 10 mL de água destilada (HUSSEY; BARKER,1973).

3.4 FORMULAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS

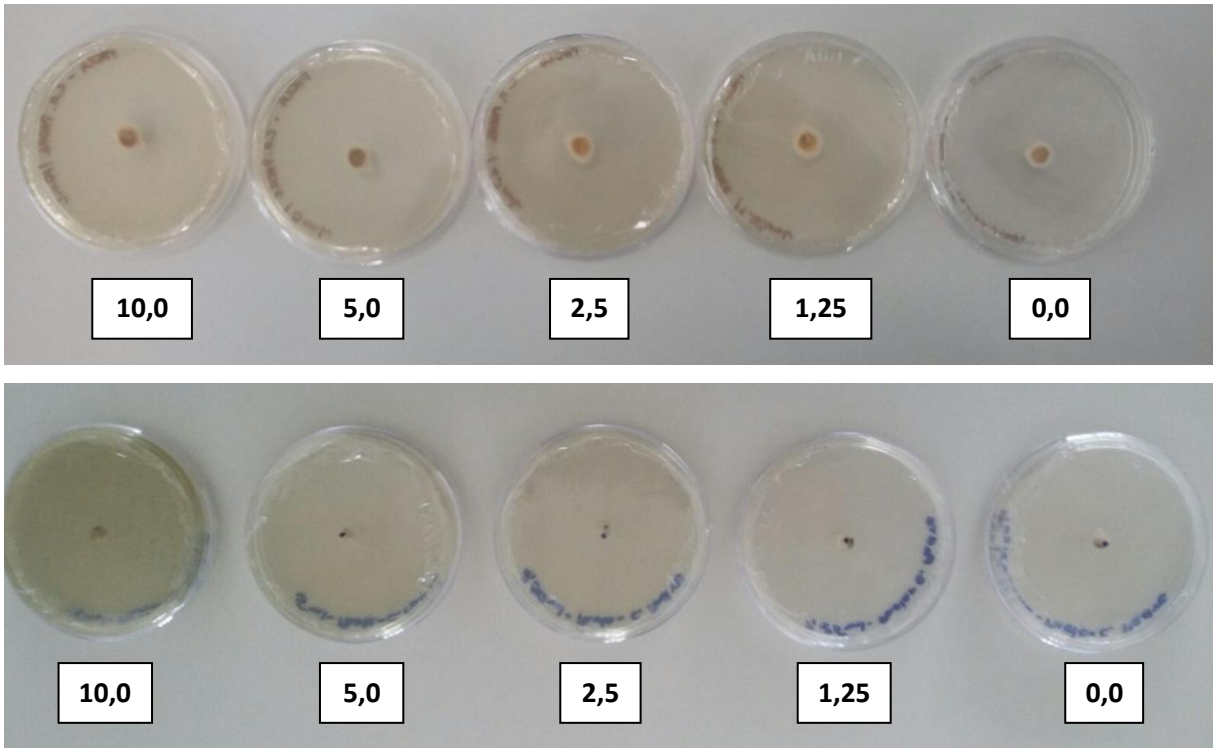
Para formulação dos extratos foram utilizados os capítulos e as folhas de calêndula previamente secos em estufa a 60° C. Os mesmos foram triturados, individualmente, no liquidificador com água destilada, onde se obteve os extratos brutos aquosos a 10%, os quais foram denominados, extrato bruto aquoso foliar a 10% (EBAFO 10%) e extrato bruto aquoso de capítulos a 10% (EBACA 10%). Posteriormente esses extratos permaneceram em repouso por um período de 8 horas, sendo em seguida filtrados com o auxílio de gaze hidrófila. Os mesmos foram conservados em geladeira em frascos envolvidos em papel alumínio, até serem utilizados.

3.5 CONDUÇÃO DOS ENSAIOS

Para avaliar a atividade fungicida de EBAFO 10% e do EBACA 10%, Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultura BDA foram fundidos em microondas, aos quais foram adicionados em temperatura aproximada de 45°C (BDA fundente), cada um dos extratos, separadamente, obtendo-se as concentrações de 1,25%; 2,5%; 5,0% e 10% (v/v), totalizando 4 tratamentos e uma testemunha (apenas com BDA) dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Após a solidificação do meio, um disco de micélio de cada um dos fungos foi repicado, separadamente, no centro das placas (Fig.3). As placas foram vedadas com filme plástico e acondicionadas em câmara climática tipo BOD com fotoperíodo de 12 horas em temperatura de 22 ± 2°C.

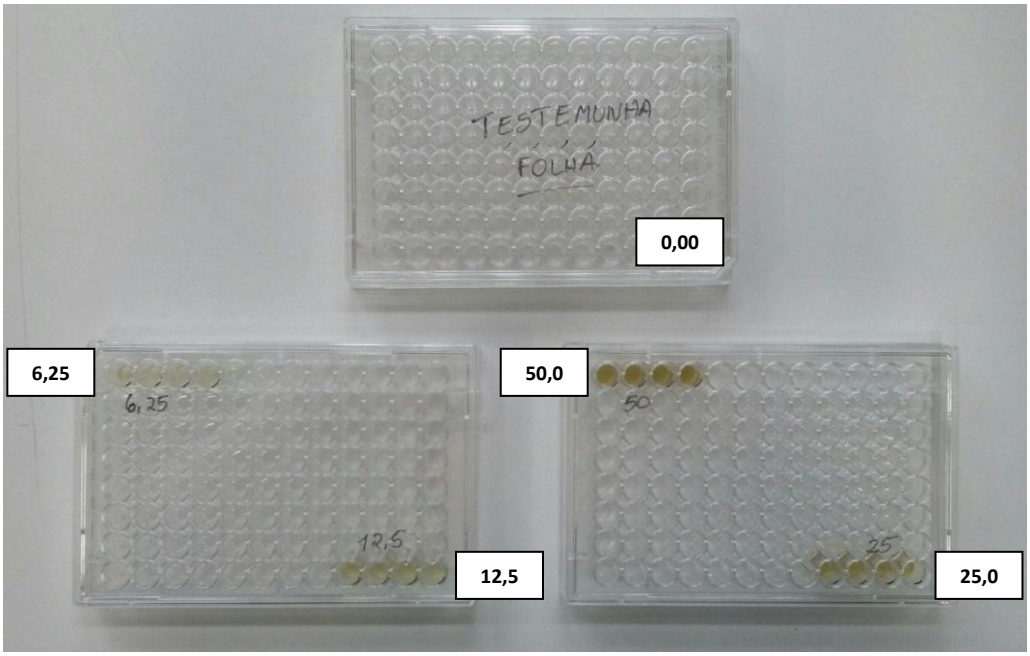
Na avaliação do efeito nematicida, a partir de uma suspensão de nematóide + ovos, foram selecionados 30 ovos que, juntamente com 30 µL de água destilada, foram depositados em cavidades de uma placa de microtitulação, do tipo ELISA. Nestas, foram adicionados os extratos nas diferentes concentrações 6,25%; 12,5%; 25%; 50% (v/v), totalizando 100µL. Além disso, foi usada uma testemunha utilizando 100µL somente de água destilada e esterilizada, totalizando 5 tratamentos com quatro repetições de cada, utilizando o mesmo delineamento (Fig.4). As placas foram vedadas com plástico filme, envoltas com papel alumínio e acondicionadas no escuro em temperatura controlada de 26 °C, por 12 dias.

Figura 3 – Placas de Petri com meio de cultura diluído nas diferentes concentrações (%) do extrato de capítulos e de folhas e, alocados em seu centro, os discos de micélio para cada um dos fungos avaliados



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – Placa de titulação do tipo ELISA, contendo extrato nas diferentes concentrações (%) (v/v)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 AVALIAÇÕES

A avaliação do crescimento micelial de cada fungo nas diferentes concentrações foi realizada quando o micélio, em uma das concentrações, alcançou o bordo da placa. O diâmetro médio foi obtido pela medição do micélio em dois pontos, diametralmente opostos

Após isso, foi realizada a avaliação da esporulação em cada um dos tratamentos para os dois fungos. Para tanto, dois discos de micélio de cada placa foram depositados em tubos de ensaio contendo 20 mL de água destilada e agitados em agitador tipo Vórtex. Os esporos foram contabilizados com o auxílio de uma câmara de Newbauer.

Para a avaliação da eclosão de *Meloidogyne hapla*, aos 4, 8 e 12 dias de incubação foi contabilizado o número de ovos eclodidos, ou seja, a presença de J2 (nematóide em fase juvenil de segundo estágio) em cada cavidade da placa de ELISA, com auxílio de lupa eletrônica.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância realizada com auxílio do software estatístico SASM-Agri. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de regressão, onde foram analisadas as variáveis: extrato/eclosão; extrato/esporulação; extrato/crescimento micelial, obtendo uma curva de resposta do comportamento das diferentes concentrações tanto para o extrato de folhas como para o proveniente dos capítulos florais. Para a análise de variância, os dados de esporulação dos fungos obtidos sofreram transformação de raiz quadrada com K=0 e, os dados obtidos de porcentagem de eclosão de nematóide sofreram transformação angular.

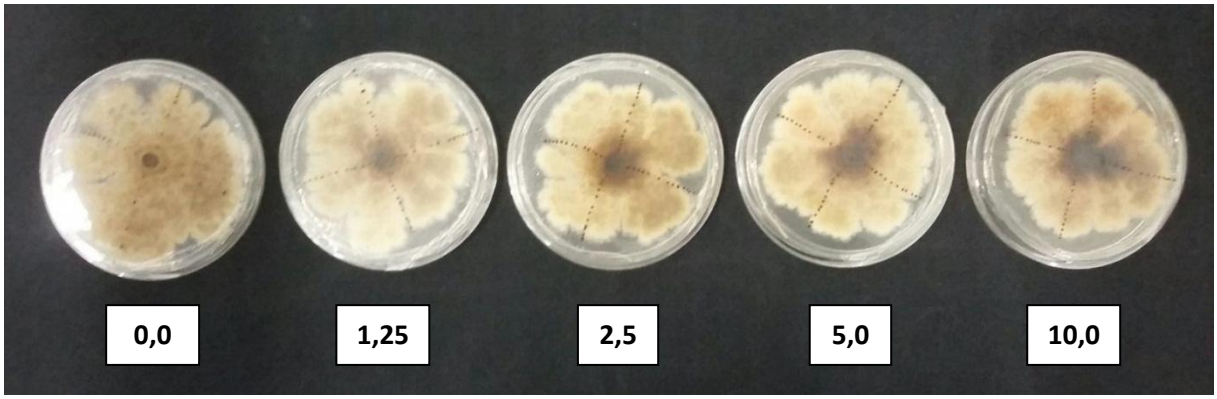
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E DA ESPORULAÇÃO

4.1.1 *Botrytis cinerea*

Em se tratando do crescimento micelial do fungo *B. cinerea* para o extrato formulado a partir dos capítulos da *C.officinalis* (Fig.5), observou-se diferença significativa entre os tratamentos testados, sendo que as concentrações de 5% e 10% foram as de melhor tratamento (Tab.1).

Figura 5 – Crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* frente às diferentes concentrações (%) do EBACA a 10% de *C. officinalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo apresentou curva de regressão quadrática, apresentando maior eficiência inibitória na maior concentração (10%) (Fig.6). Estes resultados corroboram com os encontrados por Mazaro et al. (2013), os quais em estudo com extrato de capítulos macerados de *C.officinalis* obtiveram resposta fungistática positiva para o fungo *B. cinerea* a partir de 2,5% do preparado, sendo que o extrato obtido através da maceração mostrou-se superior ao alcoólico e por infusão.

Através do extrato originado da parte aérea da planta de calêndula, Nascimento et al. (2013), demonstraram que as maiores concentrações proporcionaram resultados positivos sobre a inibição do crescimento micelial do fungo *Cercospora calendulae*. Além disso, observaram que, conforme aumentava a concentração, aumentava a porcentagem de inibição, sendo que na concentração de 1000 mg L^{-1} obtiveram 98,67% de redução do crescimento

micelial do fungo.

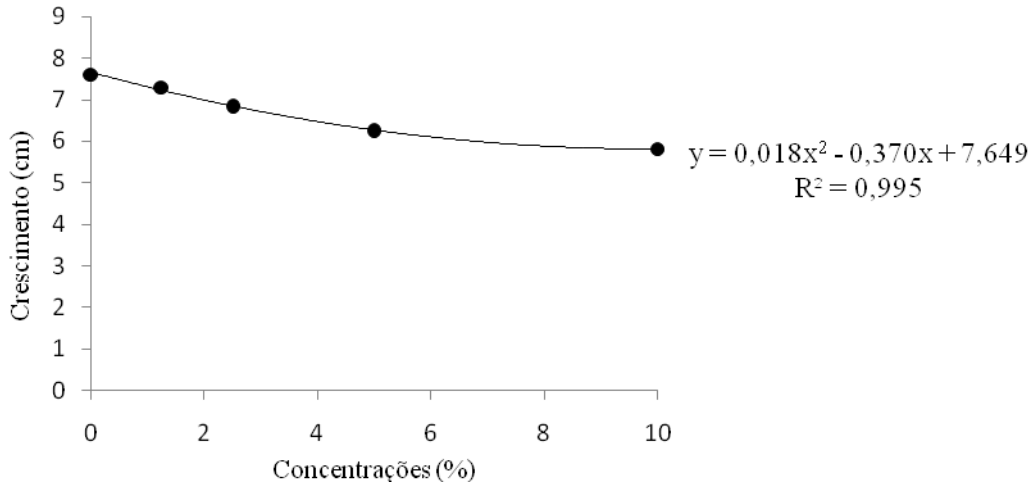
Tabela 1 – Média do crescimento micelial e análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos bruto aquoso de capítulos (EBACA 10%) e folhas (EBAFO 10%) de *C.officinalis* sobre o diâmetro micelial (cm) do fungo *Botrytis cinerea*.

Tratamentos	EBACA	EBAFO
Testemunha	7,60	4,63
1,25%	7,30	6,52
2,5%	6,82	7,12
5%	6,23	7,45
10%	5,81	7,60
F	5,10**	67,98**
CV(%)	10,09	4,39

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade. (p< .01).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Efeito de diferentes concentrações de extrato de capítulos de *C. officinalis* sobre o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea.*

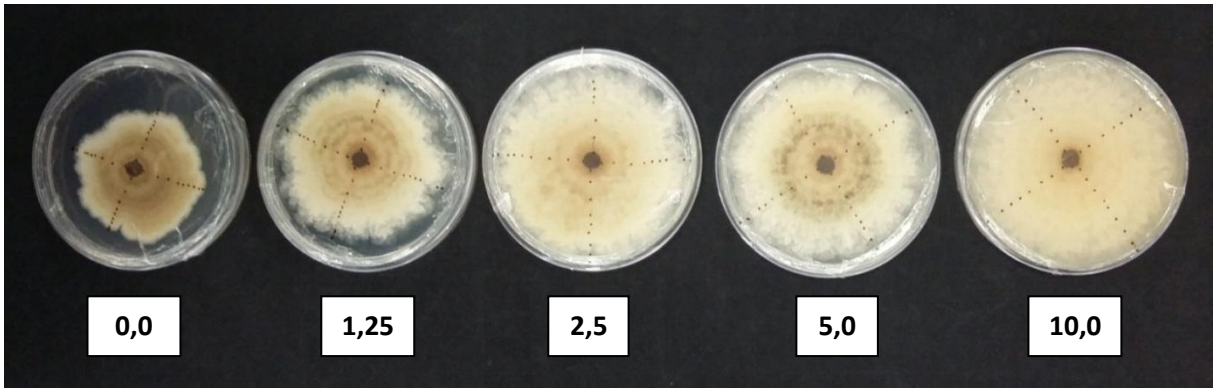


Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os dados obtidos com a aplicação das diferentes concentrações do EBAFO a 10% sobre *B. cinerea*, nenhuma das concentrações testadas inibiu o crescimento micelial do fungo, observando-se sim um efeito estimulatório de crescimento (Fig.7), com o aumento gradativo do crescimento de acordo com o aumento das concentrações (Tab.1). A curva dos

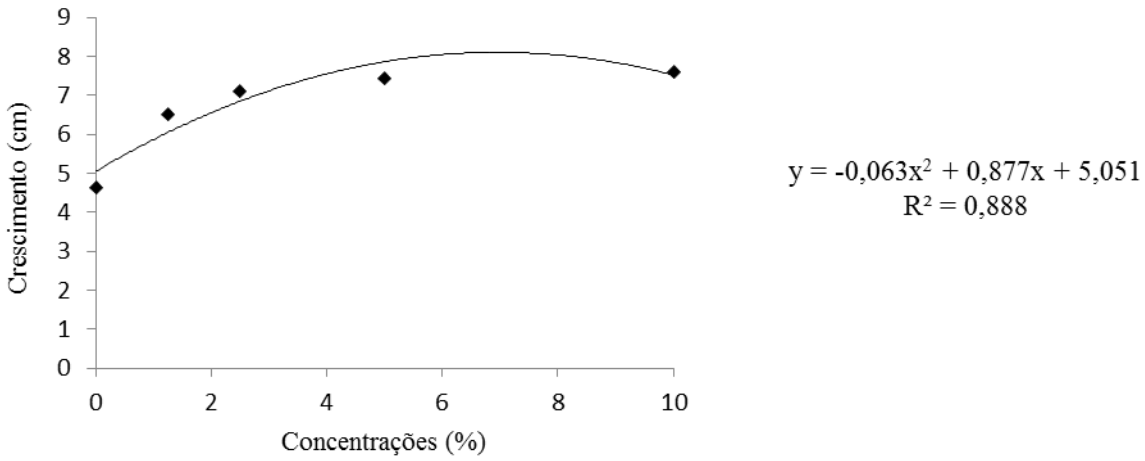
tratamentos apresentou comportamento quadrático, com o ponto de máxima eficiência na concentração de 6,96% do extrato para a promoção do efeito estimulatório (Fig.8).

Figura 7 – Crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* frente as diferentes concentrações (%) do EBAFO a 10% de *C. officinalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Efeito das diferentes concentrações de extrato de folhas de *C. officinalis* sobre o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea.*



Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito de extratos vegetais e óleos essenciais sobre *B. cinerea* já foram realizados como aquele desenvolvido por Leite et al. (2009) que, trabalhando com extrato aquoso de gengibre, obtiveram respostas inibitórias sobre o fungo *B. cinerea*, observando um aumento na inibição de acordo com o aumento das concentrações. Cunico et al. (2013), em estudo com extrato etanólico de *Ottonia martiana*, sobre *B. cinerea* só alcançaram efeito inibitório satisfatório do crescimento micelial (86,5%) quando utilizaram a maior concentração testada (1000 ppm). Lorenzetti et al. (2011), avaliaram o crescimento desse fungo utilizando óleos

essenciais de diversos compostos vegetais (capim limão, palmarosa, canela, menta, eucalipto, entre outros) e obtiveram inibição total do crescimento micelial e da esporulação do patógeno nas maiores concentrações utilizadas dos óleos oriundos de capim limão e palmarosa.

Estes resultados deixam explícito que a utilização de concentrações mais elevadas de alguns extratos pode garantir respostas promissoras quanto à inibição micelial de fitopatógenos, salientando assim a possibilidade de se testar concentrações mais elevadas do extrato foliar de *C. officinalis*. Em estudo utilizando extrato acético de várias plantas, dentre essas o alecrim (*Rosmarinus officinallis*) em concentrações diluídas a 20 e a 50% em água, e, testadas *in vitro* sobre *Botrytis cinerea*, Camatti-Sartori et al. (2011), obteve inibição de 90% do crescimento micelial do fungo, já com extrato etanólico a inibição foi de 70%. Isso também comprova que maneiras diferentes de obtenção dos extratos, assim como o uso de concentrações maiores dos mesmos, podem resultar em respostas diferentes e até mesmo mais efetivas.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos, quando avaliado a esporulação do patógeno (Tab.2).

Tabela 2 – Média do crescimento micelial e análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos bruto aquoso de capítulos (EBACA) e folhas (EBAFO) de *C.officinalis* sobre a esporulação do fungo *Botrytis cinerea*.

Tratamentos	EBACA	EBAFO
Testemunha	106	105
1,25%	107	97
2,50%	100	108
5,00%	101	129
10,0%	110	119
F	$0,08^{ns}$	$0,09^{ns}$
CV(%)	14,61	34,30

^{ns}Não significativo (p>= .005).

Fonte: Elaborado pelo autor.

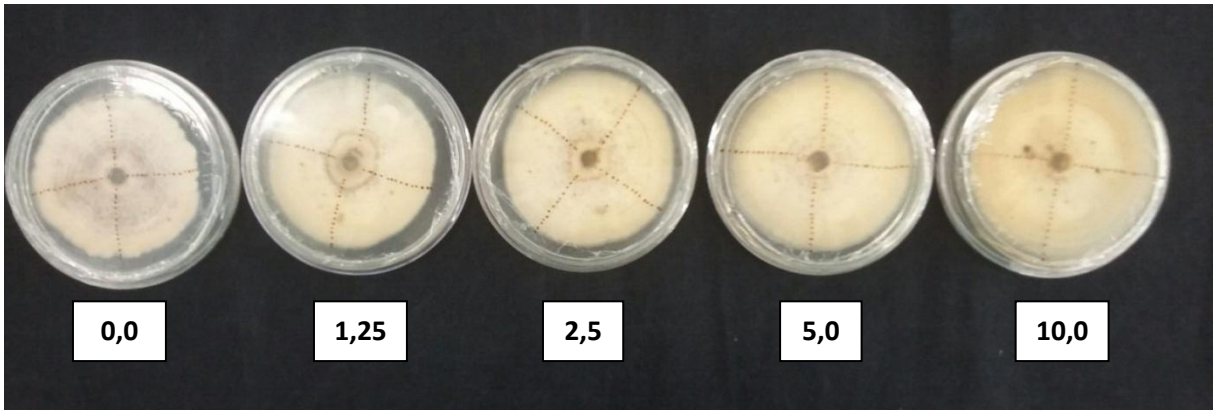
Dotto et al. (2014), em estudo com extrato de *C.officinalis* e demais preparados (pitanga, cravo e calda bordalesa) aplicados em pré-colheita nos frutos de morangueiro não observaram efeito dos tratamentos aplicados sobre a incidência de podridões de mofo cinzento, assim como sobre a esporulação do patógeno *B. cinerea*.

A cerca dos dados obtidos, observa-se que as diferentes partes da planta utilizadas na preparação dos extratos brutos aquosos, apresentaram respostas contrárias, demonstrando que a parte reprodutiva da *C. officinalis* possui efeito positivo na inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*, enquanto que a parte vegetativa estimulou o crescimento do mesmo, comprovando que há diferenças significativas nos compostos encontrados em cada parte da planta. Diante disso, reforça-se a necessidade de maiores estudos, para apurar as respostas dos preparados sobre o fungo em plantas de morangueiro.

4.1.2 Isolado *Colletotricum acutatum*

Não houve efeito fungistático de ambos os extratos sobre o fungo *C. acutatum*, porém, pode-se perceber um efeito estimulante gradativo na maioria dos tratamentos em comparação a testemunha, tanto para o extrato de capítulos (Fig.9) como para o foliar (Fig.10). Sendo nas maiores concentrações (5% e 10%) que se obteve o maior índice de crescimento em relação a testemunha (Tab.3).

Figura 9 – Crescimento micelial do fungo *Colletotrichum acutatum* frente as diferentes concentrações (%) do EBACA a 10% de *C. officinalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Média do crescimento micelial e análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos bruto aquoso de capítulos (EBACA) e folhas (EBAFO) de *C.officinalis* sobre o diâmetro micelial (cm) do fungo *Colletotrichum acutatum.*

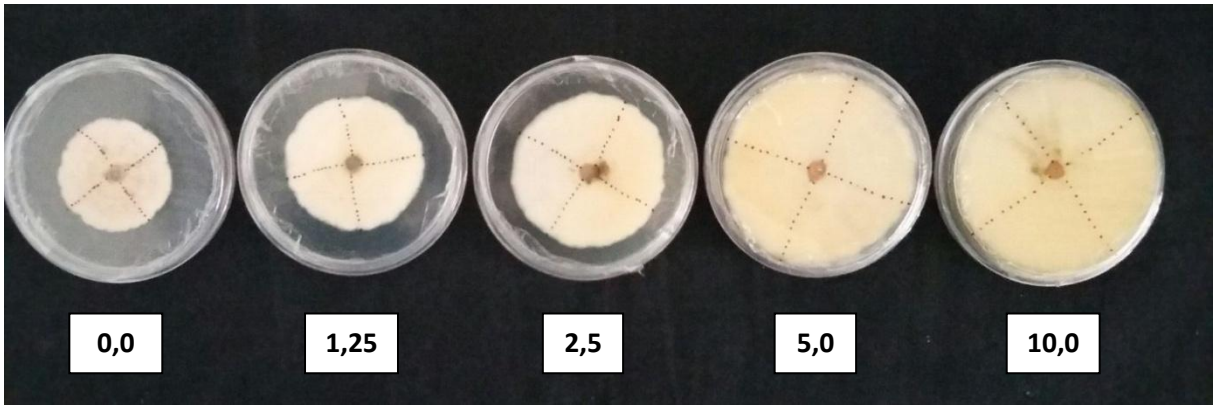
Tratamentos	EBACA	EBAFO
Testemunha	6,31	3,42
1,25%	6,50	5,75
2,5%	6,60	5,38
5%	7,02	7,31
10%	7,60	7,60
F	48,92**	5,73**
CV(%)	2,16	23,81

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade. (p< .01).

Fonte: Elaborado pelo autor.

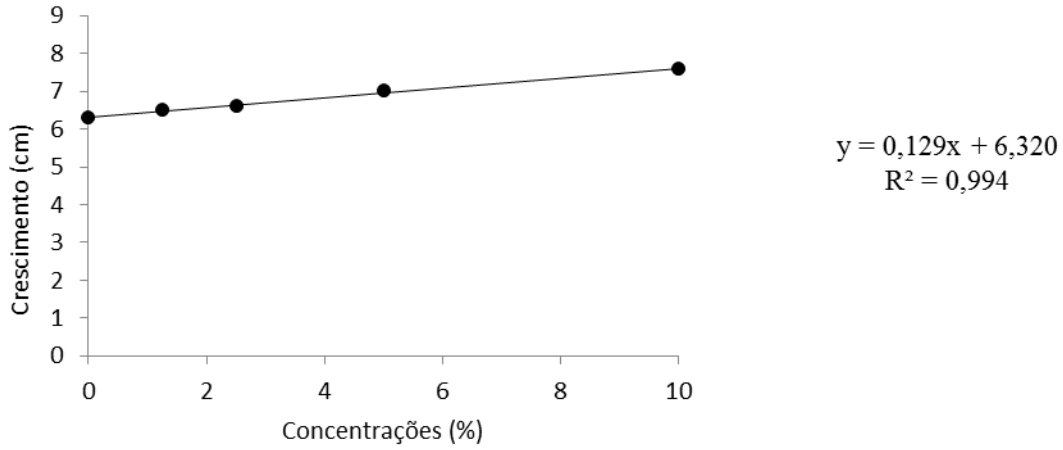
A regressão para o extrato de capítulos resultou de uma curva linear, onde o crescimento em relação à testemunha evoluiu gradativamente de acordo com o aumento das concentrações (Fig.11). Em trabalho realizado por Rozwalka (2003), utilizando *C. gloeosporioides* e extrato aquoso de *C. officinalis*, o autor observou efeito fungistático chegando a 11,28% de inibição do fungo na concentração de 10% do extrato, contrariando os resultados obtidos no presente estudo.

Figura 10 – Crescimento micelial do fungo *Colletotrichum acutatum* frente às diferentes concentrações (%) do EBAFO a 10% de *C. officinalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

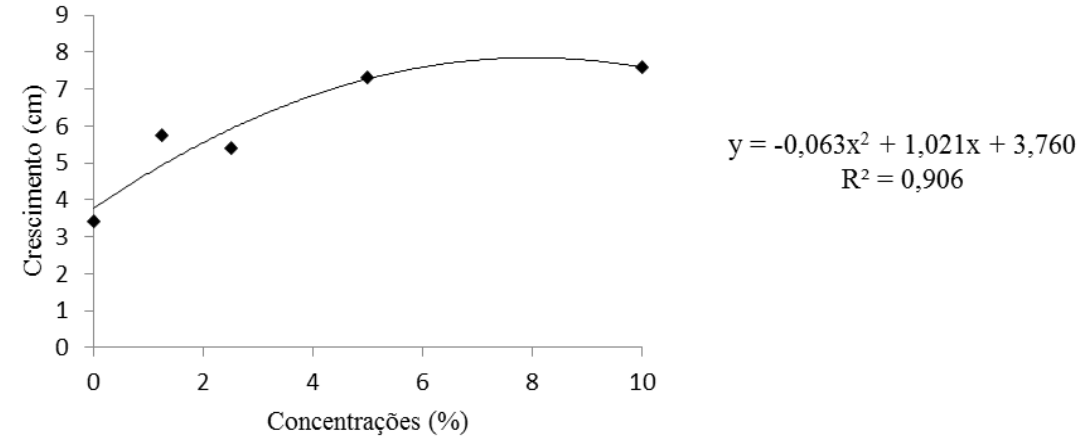
Figura 11 – Efeito das diferentes concentrações de extrato de capítulos de *C. officinalis* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum acutatum.*



Fonte: Elaborado pelo autor.

A regressão realizada para o efeito obtido através da aplicação do extrato foliar ajustou-se ao modelo quadrático, obtendo o ponto de máxima eficiência em 8,10% do extrato a 10% para a promoção do efeito estimulatório (Fig.12). Apesar dos resultados obtidos neste trabalho não demonstrarem efeito inibitório sobre o fungo *C. acutatum, v*ários estudos aplicando extratos naturais e óleos essenciais tem resultado em respostas promissoras no controle do fungo *Colletotrichum* de diversas espécies e isolados (ALMEIDA; CAMARGO; PANIZZI, 2009; DIAS-ARIEIRA, et al., 2010; SILVA, et al., 2008; SILVA, et al., 2014).

Figura 12 – Efeito das diferentes concentrações de extrato de folhas de *C. officinalis* sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum acutatum.*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Venturoso et al. (2011), testando extratos de cavalinha e jabuticaba sobre o fungo

Penicilium sp., também observaram respostas estimulantes, obtendo maior crescimento do fungo nas maiores concentrações, levando os autores a pressupor que possam existir substâncias que favoreçam ou estimulem o crescimento do fungo, o que leva-nos a crer que possa ter ocorrido no presente trabalho. Os mesmos autores trabalhando com extrato aquoso de cravo-da-índia, verificaram a ocorrência de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum sp.* após quinze dias de incubação. Silva et al. (2009), ao testar óleo essencial e hidrolatos de diversos compostos vegetais encontraram diferença na germinação de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, uma vez que os óleos essenciais inibiram 100% da germinação destes, enquanto que, os hidrolatos obtiveram pequena inibição, sendo que o de *Cymbopogon citratus* (capim santo) promoveu um discreto incremento no crescimento do fungo.

Silva (2006) reforça a teoria de que a utilização de compostos vegetais para o controle de patógenos possui alguns entraves, devido à composição química destes variar de acordo com a idade da planta, o tipo de tecido, o tipo de solo e hábitat desta. Isso esclarece, em parte, a discrepância dos dados obtidos nos diversos estudos, onde muitas vezes utiliza-se o mesmo patógeno, a mesma metodologia, porém, o material vegetal é de diferentes locais daqueles utilizados comparativamente.

Não houve diferença significativa quanto à esporulação do fungo *Colletotrichum acutatum*, não havendo assim influência de ambos os extratos sobre esta variável (Tab.4).

Estes resultados corroboram com os obtidos por Carvalho et al. (2008) ao testar os extratos de capim limão (*Cymbopogon citratus*) e palmorosa (*Cymbopogum martinii*) sobre *C. gloeosporioides* isolado de frutos de pimentão, o qual não obteve resposta inibitória na esporulação do isolado, ainda que o preparado a base de *C. martinii* estimulou a produção de esporos pelo fungo. Contudo vários estudos realizados demonstram a capacidade inibitória de extratos vegetais sobre a esporulação de diversas espécies de *Colletotrichum sp*. onde os efeitos se mostram bastante satisfatórios. Em estudo realizado *in vitro* por Almeida, Camargo e Panizzi (2009), com diversos extratos vegetais extraídos através de maceração, com concentração de 20%, estes, obtiveram respostas inibitórias favoráveis sobre a esporulação do fungo *Colletotrichum acutatum*, sendo os extratos de losna e arruda os mais eficientes.

Ribeiro e Bedendo (1999), trabalhando com isolado do fungo *C. gloeosporioides in vitro* obteve efeito inibitório da esporulação altamente satisfatório quando utilizaram extratos de hortelã, mamona e pimenta, a partir de 200 ppm do preparado, não diferindo entre si quanto a capacidade inibitória.

Tabela 4 – Média do crescimento micelial e análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos bruto aquoso de capítulos (EBACA) e folhas (EBAFO) de *C.officinalis* sobre a esporulação do fungo *Colletotrichum acutatum.*

Tratamentos	EBACA	EBAFO
Testemunha	52	13
1,25%	25	23
2,50%	21	11
5,00%	17	18
10,0%	33	8
F	$0,97^{ns}$	$0,32^{ns}$
CV(%)	50,19	55,09

^{ns}Não significativo (p>= .005).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido aos efeitos dos extratos oriundos de *C.officinalis* divergirem em grande parte, dos encontrados na literatura, acredita-se que os resultados podem diferir entre isolados e espécie de *Colletotrichum sp.*, assim como a respostas destes em relação ao preparado aplicado *in vivo*. Assim, salienta-se a importância de maiores estudos envolvendo o uso de *C.officinalis* em diferentes concentrações não apenas sobre o fungo em estudo, mas também outros patógenos que acometem a cultura do morangueiro.

4.2 INIBIÇÃO DA ECLOSÃO DE OVOS DE *Meloidogyne hapla*

Através dos dados obtidos quando se utilizou diferentes concentrações do EBACA a 10%, se observou uma diminuição na porcentagem de eclosão em relação à testemunha ainda na dose mais baixa desse extrato, sendo que a concentração de 25% foi o melhor tratamento, proporcionando um índice de eclosão de apenas 7,5% em relação à testemunha que apresentou 40% de eclosão (Tab.5).

As diferentes concentrações oriundas do extrato de capítulos de C. *officinalis,* exerceram efeito sobre a eclosão de J2 em relação à testemunha. A regressão para esse extrato resultou em uma curva polinomial de 2º grau (Fig.13).

Tabela 5 – Média da porcentagem de eclosão e análise de variância do efeito das diferentes concentrações dos extratos bruto aquoso de capítulos (EBACA) e folhas (EBAFO) de *C.officinalis* sobre a eclosão (%) de J2 de *Meloidogyne hapla.*

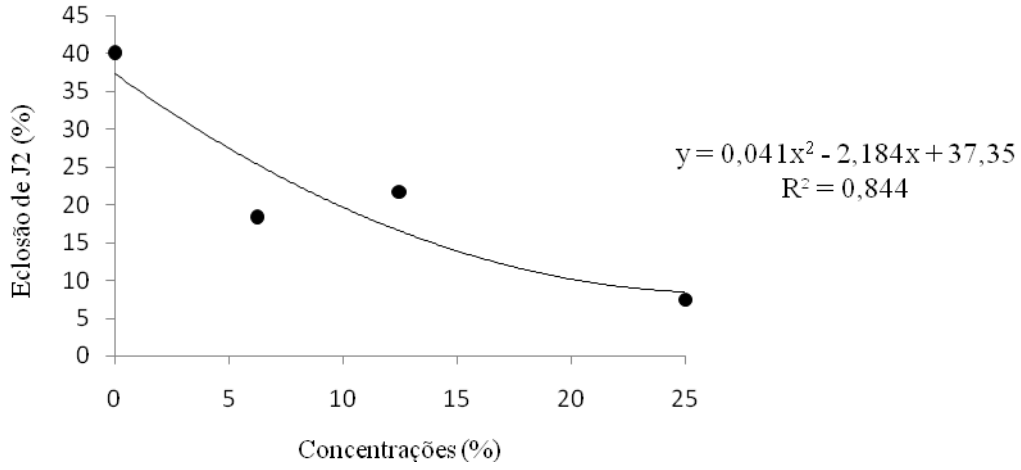
Tratamentos	EBACA	EBAFO
Testemunha	40,00	34,25
6,25%	18,25	7,50
12,50%	21,75	7,50
25,00%	7,50	12,50
50,0%	---------	---------
F	5,00*	6,62**
CV(%)	39,64	42,53

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade. (p< .01).

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade. (.01 =< p < .05).

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13 – Efeito das diferentes concentrações do EBACA a 10% de *C. officinalis* sobre a eclosão de J2 de *Meloidogyne hapla*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

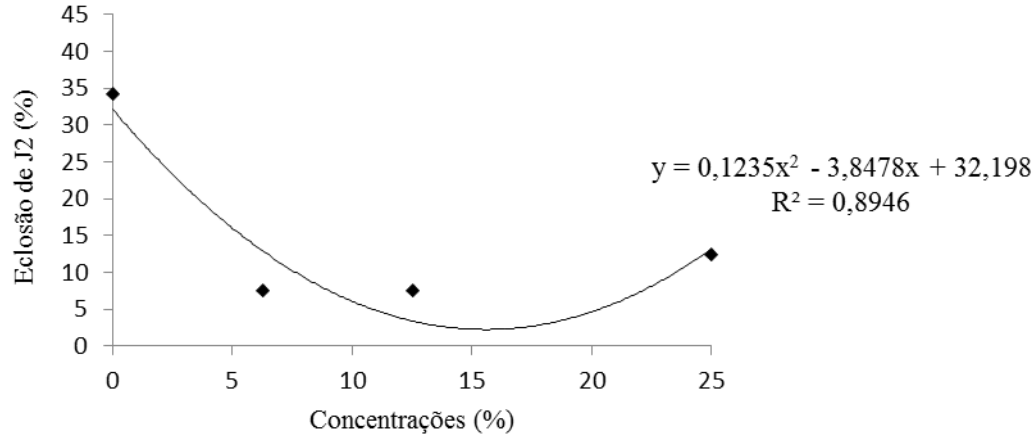
Devido a uma camada formada a partir do resíduo do extrato não foi possível realizar a avaliação na maior concentração utilizada (50%) devido à impossibilidade de contagem dos ovos eclodidos. Amaral et al. (2002), em estudo realizado em laboratório em placas de Petri, utilizando extratos aquosos e metanólicos de 12 diferentes plantas: cebola (*Allium cepa* L.); alho (*Allium sativum* L.); braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.); guandu (*Cajanus cajan* (L.) Mill.); vinca (*Catharantus roseus* G. Don); crotalária (*Crotalaria juncea* L.); Figueira

(*Ficus. Elástica* Roxb.); leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit.); romã (*Punica granatum* L.); arruda (*Ruta graveolens* L.); estilosantes (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.); e cravo-de-defunto (*Tagetes minuta* L.) obteve respostas semelhantes, onde todos os 12 preparados apresentaram resposta inibitória na porcentagem de eclosão de J2 da espécie *M. exigua* isolado de plantas de café.

Lanza et al. (2010), utilizando extratos obtidos de plantas de "chá da índia" (*Capraria biflora*) a partir de diferentes métodos de extração, obtiveram melhores respostas quanto a inibição da eclosão de J2 de *Meloidogyne incognita* a partir da maceração da planta, reforçando os dados obtidos neste trabalho, para o qual também se utilizou como método de extração a maceração.

A utilização de diferentes concentrações do EBAFO a 10% de calêndula, proporcionou diferença estatística significativa na inibição da eclosão dos ovos de *M. hapla* em relação à testemunha. É possível notar que nas concentrações de 6,25% e 12,5% do extrato, somente 7,5% dos ovos eclodiram enquanto que na testemunha chegou a 34,25% (Tab.5). Realizando a análise de regressão, se obteve uma curva quadrática, onde o ponto de máxima eficiência alcançou 15,63% do extrato (Fig.14).

Figura 14 – Efeito das diferentes concentrações do EBAFO a 10% de *C. officinalis* sobre a eclosão de J2 de *Meloidogyne hapla*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A relevância do uso de extratos naturais obtidos de fontes vegetais, também é evidenciada em estudo realizado por Mateus (2012), a qual verificou efeito inibitório dos extratos de gervão (*Verbena officinalis* L.), pau amargo (*Quassia amara* L.), tensagem (*Plantago lanceolata* L.), mulungo (*Rythrina mulungu* Mart. ex Benth) e picão (*Bidens pilosa*

L.), sendo este ultimo pertencente a família das *Asteraceae* assim como a calêndula, sobre duas espécies de nematóide das galhas (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos oriundos das partes vegetal e floral da calêndula, não apresentaram inibição total do crescimento micelial para nenhum dos isolados. O aumento nas concentrações do extrato bruto aquoso foliar a 10% estimularam o crescimento de *Botrytis cinerea* e de *Colletotrichum acutatum*, enquanto que maiores concentrações do extrato bruto de capítulos a 10% estimularam apenas *o C. acutatum*. As respostas eficientes em relação a inibição de eclosão de *M. hapla*, evidenciam o potencial desta planta, incentivando novas pesquisas com a mesma.

Conhecendo as propriedades da calêndula, salienta-se a necessidade de maiores estudos com outros isolados, tanto em fungos quanto nematóides, utilizando diversas formas de extração dos extratos, assim como estudos in vivo, procurando observar as respostas das plantas de morangueiro as aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**, **2011-2012.** Brasília, 2013. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf > Acesso em: 02 de abr. 2015.

AGROFIT Agrofit: **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 02 de abr. 2015.

ALMEIDA, Taís Ferreira; CAMARGO, Margarete; PANIZZI, Rita de Cássia. Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.3, p. 196-201, jul./set. 2009.

AMARAL, D. R. et al. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Lavras, v.26, n.1, p. 43-48, mar. 2002.

AMARO, Mirian Cristina Chaves. **A cadeia produtiva agro-industrial de morango nos municípios de Pelotas, Turuçu e São Lourenço.** 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Administração). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Pós-graduação em Administração, Porto Alegre, 2002.

ANTUNES, L. E. C. et al. Produção integrada de morango (PIMo) no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n.236, p. 34-39, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i prodottori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Revista di Frutticoltura,** Bologna, v. 69, n. 5, p. 60-65, 2007.

ANTUNES, O. T. et al. Floração, frutificação e maturação de frutos de morangueiro cultivados em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Passo Fundo, v.24, n.4, p. 426-430, out./dez. 2006.

BETTIOL, Wagner.; GHINI, Raquel. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativo. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W.; (Eds.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário.** 1.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003, p.79-95.

BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Buschinelli (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**.1.ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p. 332.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra Colletotrichum lagenarium, pelo extrato aquoso de Eucalyptus citriodora. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.128-134, mar./abr. 2004.

BORBA, Elder Tschoseck. ***Calendula officinalis* L. (Asteraceae): caracterização da produção orgânica e análise da influência de insetos sobre a atividade farmacológica.** 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2010.

BRAGA, Daniela Oliveira. **Qualidade pós-colheita de morangos orgânicos tratados com óleos essenciais na pré-colheita.** 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Lavras, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE n.º 84, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, Seção 1, p. 84, 2004. Disponível em: < http://www.jusbrasil.com.br/diarios/DOU/2004/03/17 >. Acesso em: 17 de abr. 2015.

CAMARGO, L. S.; SCARANARI, H. J.; IGUE, T. Efeito do tipo de mudas na produção de morangueiro. **Bragantia**, Campinas, v.33, n.3, p. 23-31, mar. 1974.

CAMATTI-SARTORI, V. et al. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Caxias do Sul, v.6, n.2, p.117-122, abr. 2011.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.33, n.1, p.34-39 , jan./mar. 2007.

CARVALHO, J. B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CETKOVIC, G. S. et al. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International,** Serbia and Montenegro, v.37, n. 7, p.643-650, aug. 2004.

CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E. T. *Calendula officinalis* L.(Asteraceae): Aspectos botânicos, ecológicos e usos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.1, 23p., jan./mar. 2012.

COCCO, Carine et al. Produção de cultivares de morangueiro de dias curtos na região de pelotas – RS. In: Encontro de Pós-graduação UFPel, 13, 2011, Pelotas. **Anais eletrônicos**... Pelotas: Ufpel, 2011. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/917734/1/CA00045.pdf> Acesso em: 17 de abr. 2015.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agronômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 419-423, set. 2002.

COSTA, Hélcio; VENTURA, José Aires; LOPES, Ueder Pedro. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In: 51º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51., 2011, Viçosa. **Anais**... Viçosa: Horticultura Brasileira, 2011.

CUNICO, M. M. et al. Avaliação do real potencial inibidor de extratos etanólicos de *Ottonia martiana* sobre *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea*. **Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 2, p. 225 - 230, abr./jun. 2013.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro**. Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 228-232, jul./set. 2010.

DOTTO, M. et al. Aplicação pré-colheita de extratos vegetais em morangueiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pato Branco, v.9, n.1, p.240-247, fev. 2014.

FERRAZ, Silamar et al. Controle de fitonematoides com o uso de extratos e óleos essenciais de plantas. In: POLTRONIERI, Luiz Sebastião; ISHIDA, Alessandra Keiko Nakasone (Org.). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas:** panorama atual e perspectivas na agricultura. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008. 308 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura:** agrotecnolgia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. São Paulo: UFV, 2008. p.421.

FOGOLARI, Hoilson. **Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução de resistência e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea in vitro*.** 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Pato Branco, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. FAOSTAT: **Agricultural Production/strawberry 2012.** Disponível em:< http://faostat.fao.org>. Acesso em: 04 de abr. 2015.

GOMES, C. B.; COFCEWICZ, E. T. **Sistema de produção do morango: Nematóides fitoparasitas do morangueiro.** Embrapa Cilma Temparado: Sistema de produção, Pelotas, v.5, 2005. Disponível em: < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap08.htm> Acesso em: 06 de abr. 2015.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp*., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v.57, p.1025-1028, 1973.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário 2006.** Rio de Janeiro: 2006. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf >. Acesso em: 02 de abr. 2015.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia:** Doenças das plantas cultivadas**.** 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997, v.2, p.516-530, 1997.

KOSOSKI, R.M.; FURLANETTO, C.; TOMITA, C.K. & CAFÉ FILHO, A.C. Efeito de fungicidas em Colletotrichum acutatum e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.662-666, set. 2001.

LANZA, F. E. et al. Efeito de *Capraria biflora* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* in vitro. **Unimontes Científica**. Montes Claros, v.12, n1/2, jan./dez. 2010.

LEANDRO, L. S. S. et al. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology.** Saint Paul, v.91, n.7, p.659-664, jul. 2001.

LEITE, Carla Daiane et al. Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* pelo extrato aquoso de gengibre. In: Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão - UNICENTRO, 2009, Guarapuava. **Anais eletrônicos...** Guarapuava: UNICENTRO, 2009. Disponível em: < http://anais.unicentro.br/siepe/2009/pdf/resumo_163.pdf > Acesso em: 15 de out. 2015.

LORENZETTI, E. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n. spe, p.619-627, 2011.

LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** 4 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, p. 341, 2008.

MADAIL, J. C. M. et al. Avaliação econômica dos sistemas de produção de morango: convencional, integrado e orgânico. **Comunicado técnico Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, n.181, 4 p., 2007.

MADAIL, J. C. M. et al. Avaliação de impactos econômicos, sociais e ambientais de sistema protegido de morango no município de Turuçu- RS. **Comunicado técnico Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, n.221, 18 p., 2009.

MATEUS, Milena Aparecida Ferrari. **Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de nematóides das galhas**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Guarapuava, 2012.

MAZARO, S. M. et al. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 185-190, mar. 2008a.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1824-1829, out. 2008b.

MAZARO, S. M. et al. Potencial de extratos à base de Calendula officinalis L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre Botrytis cinerea, in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.15, n.2, p.208-216, 2013.

NASCIMENTO, J. M. et al. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.15, n.4, p.751-756, out. 2013.

PIRES, R. C. M. et al. Profundidade efetiva do sistema do sistema radicular do morangueiro sob diferentes coberturas do solo e níveis de água. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 793-799, abr. 2000.

PORTOCARRERO, Márcio Antônio; KOSOSKI, Adilson Reinaldo. Alimentos seguros – uma política de governo. In. **Produção integrada no Brasil**: agropecuária sustentável, alimentos seguros/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Secretária de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo – Mapa/ACS, 2009. 1008 p.

REIS, A.; COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **Circular técnica Embrapa**, Brasília, n. 96, p. 2-6, 2011.

REISSER JUNIOR, Carlos. et al. Palestras e resumos. In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO E III ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 4. 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.4, p. 1267-1271, 1999.

ROZWALKA, Luciane Cristina. **Controle alternativo da antracnose em frutos de goiabeira, em laboratório**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Curitiba, 2003.

SANHUEZA, R. M. V. et al. **Sistema de Produção de Morango para Mesa da Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. Importância da Cultura.** Sistema de Produção. Versão Eletrônica. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> Acesso em: 31 de mar. 2015.

SILVA, A. C. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, vol.33, n.spe, p. 1853-1860, 2009.

SILVA, F. H. A. et al. Extratos aquosos de plantas na inibição do *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e em goiaba pós-colheita. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 1, p. 93 – 99, jan./mar. 2014.

SILVA, Gilson Soares da. Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 31. 2006, Salvador. **Anais...** Salvador: Fitopatologia Brasileira, 2006.

SILVA, M. B. et al. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SILVA, T. P. **Características produtivas e físico-químicas de frutos de morangueiro orgânico cultivado com o uso de extrato de algas.** 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Curitiba, 2011.

SILVEIRA, M. A. M.; VILLELA, F. A.; TILLMANN, M. A. A. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol.24, n.2, p. 31-37, 2002.

SPECHT, Suzimary; BLUME, Roni. Competitividade e segmento de mercado à cadeia do morango: algumas evidências sobre o panorama mundial e brasileiro. In: SOBER - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: SOBER, 2009.

TÖFOLI, J. G. et al. *Botrytis sp.* em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo. v.73, n.1, p. 11-20, jan./jun. 2011.

UENO, B. Antracnose do morangueiro ("flor preta") causada por *Colletotrichum acutatum*. **Informe de pesquisa Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR**, Paraná, ano IX, n. 119, 11 p., 1996.

VAILATI, T.; SALLES, R. F. de M. Rendimento e qualidade de frutos de morangueiro sob diferentes coberturas de solo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 29-37, jan./mar. 2010.

VENTUROSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.1, p.18-23, jan./mar. 2011.