

Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*)*

Solange Maria Bonaldo^{1,3}; Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada^{1,4}; José Renato Stangarlin^{2,4}; Maria Eugênia Silva Cruz¹; Ana Cristina Grade Fiori-tutida¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo 5790, Cep 87.020-900, Maringá-PR, Brasil, email: schwan@wnet.com.br. ²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 1008, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon. ³Bolsista PIBIC-CNPq. ⁴Bolsistas de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

*Trabalho de Iniciação Científica do primeiro autor.

Autor para correspondência: Kátia R.F. Schwan-Estrada.

Data da chegada: 30/01/2006. Aceito para publicação em: 16/01/2007.

1317

RESUMO

Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J. R.; Cruz, M.E.S.; Fiori-Tutida, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica*, v.33, n.4, p.383-387, 2007.

Compostos secundários presentes em plantas medicinais desempenham funções importantes em interações planta-patógeno, por ação antimicrobiana direta ou induzindo a síntese de mecanismos de defesa em outras plantas. Para verificar o efeito fungitóxico do eucalipto sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfisii*, *Phytophthora* sp, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum sublineolum*, o extrato bruto (EB) foi incorporado ao BDA e o óleo essencial (OE) foi distribuído na superfície do meio com alça de Drigalski. A germinação de esporos de *C. sublineolum* também foi avaliada na presença de diferentes alíquotas de OE. Para verificar a indução de fitoalexinas, mesocótilos de sorgo foram aspergidos com EB a 20% ou então, mergulhados em suspensões do OE. Para a indução de gliceolina, 20 µL do EB foram colocados em cotilédones de soja. A presença de

compostos fungitóxicos no OE e EB através da cromatografia de camada delgada também foi avaliada. Os resultados evidenciaram inibição do crescimento micelial dos fungos para concentrações do EB acima de 20%. Todas as alíquotas do óleo inibiram o crescimento micelial dos fungos testados, com exceção de *R. solani* cuja inibição ocorreu para alíquotas acima de 20µL. Houve inibição de 100% na germinação dos conídios para todas as alíquotas do OE testadas na primeira metodologia, porém, na segunda metodologia o OE não promoveu inibição da germinação de esporos. Entretanto, foram observadas alterações na morfologia dos tubos germinativos e inibição da formação de apressórios. Observou-se a presença de apenas uma fração fungitóxica no OE, e o EB não apresentou frações fungitóxicas. Houve a produção de fitoalexinas apenas em mesocótilos de sorgo tratados com o EB.

Palavras-chave adicionais: deoxiantocianidinas, gliceolina, compostos secundários, planta medicinal.

ABSTRACT

Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J. R.; Cruz, M.E.S.; Fiori-Tutida, A.C.G. Contribution for the study of antifungal and phytoalexins elicitors in sorghum and soybean activities by eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica*, v.33, n.4, p.383-387, 2007.

Secondary compounds found in medicinal plants play important role in plant-pathogen interactions by having direct antimicrobial effect on them or inducing the defense mechanisms on defense of other plants. To verify the fungi toxic effect of the eucalyptus on the micelial growth of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfisii*, *Phytophthora* sp, *Alternaria alternata* and *Colletotrichum sublineolum*, the crude extract (CE) was incorporate to PDA and the essential oil (EO) and distributed in the surface of the middle with Drigalski loop. Germination of spores of *C. sublineolum* was also evaluated in the presence of different brackets of EO using two methodologies. In order to verify the induction phytoalexins sorghum mesocotyls were asperged with CE to 20% or then dived in suspensions of EO. For the gliceolin

induction, 20 µL of CE were put in cotyledons soybean. The presence of fungitoxic compounds in EO and CE through the thin layer chromatography was also evaluated. The results evidenced inhibition of the fungus micelial growth for concentrations of CE above 20%. All of the aliquots of the oil inhibited micelial growth micelial fungi, except for *R. solani* whose inhibition happened for aliquots above 20µL. There was inhibition of 100% in conidia germination for all of the aliquots of EO tested in the first methodology. However, in the second methodology EO did not promote inhibition of conidia germination. It was observed the presence of one fraction fungitoxic in EO, and CE did not present fungitoxic fractions. There was the phytoalexins production just in sorghum mesocotyls treated with CE.

Additional Keywords: deoxyanthocyanidin, gliceollin, secondary compounds, medicinal plant.

Alguns dos problemas associados à utilização de agrotóxicos para o controle de doenças em plantas incluem freqüentes falhas no controle, devido à aquisição de resistência por parte dos fitopatógenos, contaminação ambiental e danos à saúde dos seres humanos. Em função destas preocupações e das pressões exercidas pela sociedade, houve um incentivo para que pesquisadores e produtores buscassem novos caminhos para o controle de doenças nas mais diferentes culturas (6, 7). Neste contexto, o uso de plantas medicinais para o controle de fitopatógenos tem sido demonstrado em diversos trabalhos.

Segundo Bankole & Joda (1) o óleo essencial e o pó de folhas de capim limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) reduzem a extensão da deterioração em sementes de melão inoculadas anteriormente com *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamarii* e *Penicillium citrinum*. Os autores verificaram, também, que o óleo essencial de capim limão nas concentrações de 0,1 e 0,25% (v/m) proporcionou significativa redução da produção de aflatoxina em sementes descascadas e inoculadas com *A. flavus*. Altas concentrações do óleo essencial (0,5 e 1,0 v/m) preveniram completamente a produção de aflatoxina nas sementes.

A atividade antifúngica de diferentes concentrações do extrato etanólico de espinheira-santa (Burch. ex London) Planch sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium spathulatum* foi avaliada por Cunico et al. (4). Os resultados mostraram que o extrato inibiu em mais de 10% o crescimento micelial de *F. oxysporum*, nas três concentrações avaliadas (0,2; 0,4 e 0,6 mg/mL), estimulou o crescimento micelial de *C. acutatum* em mais de 30% na concentração de 0,2 mg/mL e algumas de suas frações inibiram o desenvolvimento de *C. spathulatum*.

Folhas secas de *Lippia alba* em contato com suspensão de esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, promoveram o aumento do comprimento e da largura dos tubos germinativos formados, a inibição da formação de apressórios e substâncias solúveis em etanol exerceram efeito fungistático *in vitro* (8).

Bonaldo et al. (3) verificaram o potencial de *Eucalyptus citriodora* no controle alternativo de antracnose em pepino utilizando extrato aquoso (EA) desta essência florestal, autoclavado ou não autoclavado, em diferentes concentrações e observaram que houve inibição total na germinação de esporos e formação de apressórios de *Colletotrichum lagenarium* em concentrações de 20% e 1% do EA autoclavado, respectivamente. Para o extrato não autoclavado houve 75% de inibição da germinação de esporos em 25% do EA e inibição total da formação de apressórios em 15% do EA.

Assim, verifica-se que o uso de *E. citriodora* bem como de outras plantas medicinais, no controle de fitopatógenos presentes no solo ou na parte aérea de plantas, apresenta um futuro promissor. Em função do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar: i) o efeito do óleo essencial e do extrato aquoso (EA) de *E. citriodora* no crescimento micelial de alguns fungos fitopatogênicos, bem como na formação de apressórios e germinação de conídios por *C. sublineolum*; ii) verificar o efeito do EA na indução de fitoalexinas em sorgo e soja e iii) detectar, através de cromatografia de camada delgada, os compostos fungitóxicos presentes tanto no óleo essencial quanto no extrato bruto aquoso.

MATERIALE MÉTODOS

Fungos fitopatogênicos

O efeito do óleo essencial e do extrato bruto aquoso de *E. citriodora* foi verificado sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *C. sublineolum* e *Alternaria alternata*.

Crescimento micelial *in vitro*

Na obtenção do extrato bruto (EB) folhas frescas da planta medicinal eucalipto (*E. citriodora*) foram trituradas em água destilada por 3 min., em liquidificador. O homogenato resultante foi filtrado em gaze e em papel de filtro Whatman nº 1, obtendo-se o extrato bruto aquoso, o qual foi incorporado ao BDA de modo a se obter concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 50% e autoclavados a 120° C 1 atm por 20 min. Após a solidificação do meio, um disco de 8 mm de diâmetro contendo micélio dos isolados dos fitopatógenos, com 15 dias de idade, foi repicado para o centro das placas, as quais foram vedadas e mantidas a 28° C e no escuro. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento. O tratamento controle continha apenas o meio BDA. A avaliação foi realizada através da medição diária do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), 24 horas após a instalação do experimento e perdurou até o momento em que as colônias fúngicas no tratamento controle cobriram 2/3 da superfície do meio de cultura. Ensaio semelhante foi realizado com óleo essencial de *E. citriodora* obtido por arraste a vapor, a partir de folhas secas ao ar. Após esterilização em filtro (0,2 mm) descartável para seringa, alíquotas de 20, 40, 100, 500 e 1000 mL do óleo essencial foram colocadas no centro de placas de Petri contendo cerca de 20 mL de BDA e distribuídas sobre a superfície do meio com alça de Drigalsky.

Germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum*

Na germinação de conídios por *C. sublineolum* foram utilizadas duas metodologias. Na primeira, lâminas de microscopia foram cobertas com uma fina camada agar-água e sobre estas foram colocadas alíquotas de 5, 10, 20, 40 e 60 µl do óleo essencial e 100 µl de uma suspensão de esporos (2x10⁴ conídios/mL) de *C. sublineolum*, permanecendo em câmara úmida por 22 horas, sob luz constante e 24 °C. Após este período, com auxílio de microscópio óptico, foi realizada a contagem de conídios germinados e apressórios formados. Na segunda metodologia empregada, suspensões do óleo essencial dissolvidas em água destilada mais Tween (20%) nas concentrações de 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ e 10⁻¹⁰ foram colocadas sobre a superfície de placas de Petri contendo agar-água (2%). Como tratamentos controles foram utilizadas água destilada e água destilada+Tween. Em seguida, adicionou-se 100 µL da suspensão de esporos (1x10⁵ esporos/mL) de *C. sublineolum* que foi distribuída sobre a superfície do BDA com auxílio de alça de Drigalsky. As placas de Petri foram então incubadas sob luz constante, a 27 °C, por um período de 20 horas. Após este período, com auxílio de microscópio óptico, foi realizada a contagem de conídios germinados.

Cromatografia de camada delgada

Alíquotas de 100 µL do óleo essencial e do EB de *E. citriodora* foram utilizadas para a cromatografia de camada delgada em placas de sílica-gel 60 com indicador fluorescente (254 nm), pré-lavadas com clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Após a colocação das amostras sobre as placas e secagem sob fluxo de ar, foi realizada a separação dos compostos usando butanol/ácido acético/água (6:1:2, v/v/v) como sistema de solvente. Os compostos foram visualizados sob luzes visível e ultravioleta longo (365 nm) e curto (254 nm). A seguir, as placas de sílica-gel secas contendo as bandas individuais foram aspergidas com suspensão de esporos de *C. sublineolum* (1x10⁵ conídios/mL em meio líquido Czapeck) e mantidas sob umidade relativa de 100% a 25°C e luz. Após 48 horas, as placas foram observadas para a presença de zonas de inibição de crescimento micelial ao redor das bandas individuais.

Produção de fitoalexinas em sorgo e soja

Para a síntese de fitoalexinas em sorgo, mesocótilos de sorgo, estiolados, foram aspergidos com EB de *E. citriodora* e com suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae*, *C. sublineolum* ou expostas à UV (265 nm) por uma hora, como tratamentos controle. Após 3 dias, 3 mesocótilos foram cortados (0,5 mm) e colocados em 2 ml de metanol acidificado por 60 horas a 4°C para a extração dos pigmentos. A leitura de absorbância foi a 480 nm.

Para verificar a síntese de fitoalexinas pelo óleo essencial de *E. citriodora*, 3 mesocótilos de sorgo foram colocados em tubos de ensaio contendo os tratamentos com óleo essencial a 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} ; e os tratamentos controle: água destilada e água destilada+Tween. Os tubos de ensaio foram colocados sob luz constante por aproximadamente 60 horas, a uma temperatura constante de 24 C. Após 3 dias, 3 mesocótilos foram cortados (0,5 mm) e colocados em 2 ml de metanol acidificado por 60 horas a 4°C para a extração dos pigmentos. A leitura de absorbância foi a 480 nm.

Para a síntese de gliceolina, cotilédones de soja foram retirados das plântulas, lavados com água destilada e seccionados na superfície inferior. Seis cotilédones foram colocados em placas de Petri com papel de filtro umedecido. Aliquotas de 20 µl de EA de *E. citriodora*, de *S. cerevisiae* ou de *C. sublineolum* foram aplicados sobre a lesão. Como controle, foi utilizada água destilada esterilizada. Após 20 horas, os cotilédones foram transferidos para tubos com 10 ml de H₂O destilada esterilizada e agitados por uma hora. A leitura de absorbância foi a 285 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento micelial *in vitro*

O efeito inibitório de diferentes concentrações do EB de *E. citriodora* sobre os fungos *R. solani*, *S. rolfii*, *C. sublineolum*, *Phytophthora* sp e *A. alternata* está representado na Figura 1. Observa-se que a partir de 20% da concentração do extrato bruto, todos os fungos apresentaram inibição do crescimento micelial, e que *Phytophthora* sp. e *C. sublineolum* apresentaram a maior inibição do crescimento micelial, seguidos de *S. rolfii*, *R. solani* e *A. alternata*.

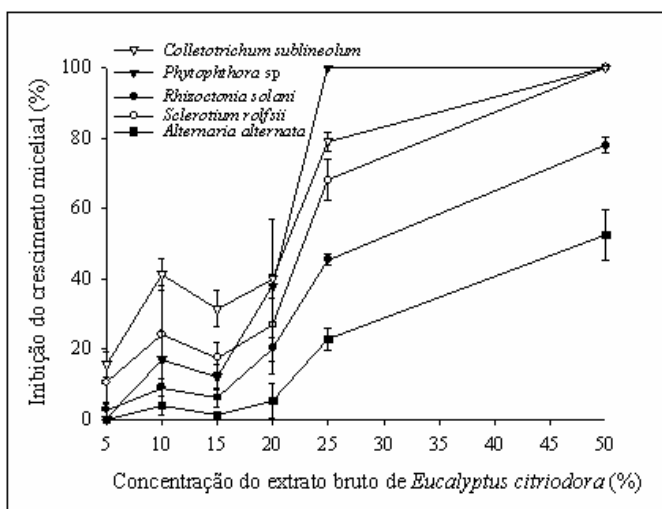


Figura 1. Inibição do crescimento micelial de fitopatógenos na presença de diferentes concentrações de extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*. As barras representam o desvio padrão da média de 5 repetições.

Já o óleo essencial, nas alíquotas de 40, 100, 500 e 1000 µL promoveu 100% de inibição do crescimento micelial dos fungos testados. Na alíquota de 20 µL houve 100% de inibição do crescimento micelial para *S. rolfii*, *Phytophthora* sp, *A. alternata* e *C. sublineolum* e de 90% para *R. solani*. Os resultados obtidos concordam com os de Fiori et al. (5) que trabalhando com os óleos essenciais de *E. citriodora*, *C. citratus* e *A. conizoides*, verificaram que os mesmos inibiram o crescimento micelial de *Didymella bryoniae* em 100% nas alíquotas testadas (20, 40, 60, 100, 200, 500 e 1000 µL), e que o óleo essencial de *A. millefolium* nas alíquotas de 20, 40, 60, 100 e 200 µL promoveu inibição do crescimento micelial em 35,02%, 50,46%, 57,02%, 74,53% e 89,29% respectivamente e nas alíquotas de 500 e 1000 µL ocorreu 100% de inibição. Barros et al (2) avaliando o efeito do extrato de bulbo de alho no crescimento micelial de *Curvularia brachyspora*, *C. pallescens*, *A. alternata* e *A. longipes* verificaram que todos os fungos foram sensíveis à concentração de 250 ppm, havendo redução significativa no diâmetro das colônias com o aumento das concentrações do extrato de alho.

Germinação de conídios e formação de apressórios por *C. sublineolum*

Nos resultados da primeira metodologia utilizada para a avaliação da germinação de conídios de *C. sublineolum* nas alíquotas testadas de óleo essencial de *E. citriodora*, observou-se que substância (s) presente(s) no óleo essencial inibe (m) em 100% a germinação e formação de apressórios por *C. sublineolum* em todas as alíquotas testadas.

Na Figura 2, são ilustrados os resultados da segunda metodologia utilizada para a avaliação da germinação de conídios e formação de apressórios de *C. sublineolum*. Em todas as suspensões do óleo essencial houve germinação de esporos, porém, sem formação de apressórios. Alterações na morfologia dos tubos germinativos foram observadas. Na concentração de 10^{-2} do óleo essencial, os tubos germinativos eram pequenos, praticamente do mesmo tamanho dos esporos; na concentração do óleo essencial de 10^{-4} os tubos germinativos eram pequenos (mesmo tamanho ou menores que o esporo), ou então extremamente longos. Tubos menores que os esporos foram observados na concentração de 10^{-6} do óleo essencial.

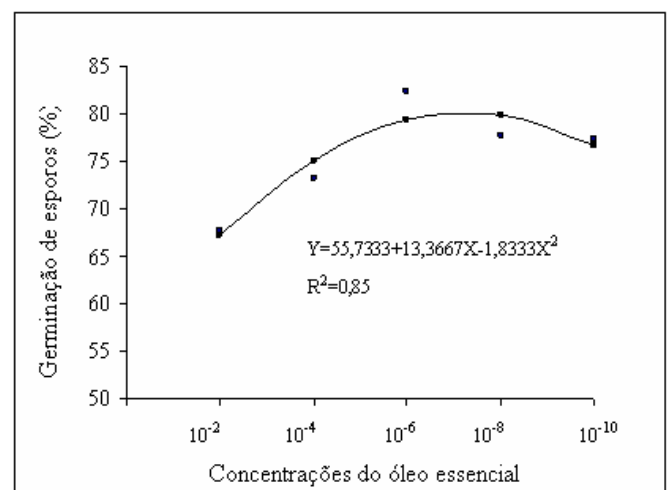
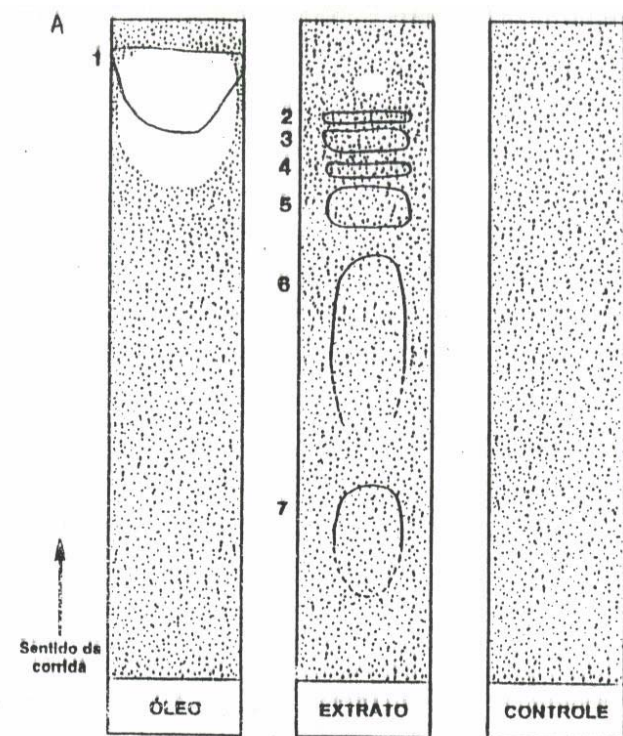


Figura 2. Germinação de esporos de *Colletotrichum sublineolum* em diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*. Controles: Água: $80 \pm 12,16$. Água + Tween: $83 \pm 2,00$.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos por Santos et al. (8) que verificaram que a formação de apressórios por conídios de *C. gloeosporioides* foi afetada em todos os tratamentos contendo discos de folhas secas de *Lippia alba* e que afetaram também o tamanho (comprimento e largura) dos tubos germinativos, que apresentaram-se mais longos e mais largos. Stangarlin et al. (11) observaram que ocorreu estímulo da germinação de esporos e redução de 14 a 34% na formação de apressórios de *C. graminicola* (Ces.) Wilson, em concentrações do extrato bruto de *E. citriodora*, não autoclavado acima de 10%.

Bonaldo et al. (3) relataram inibição total na germinação de esporos e formação de apressórios por *C. lagenarium* em concentrações de 20% e 1% de extrato aquoso de *E. citriodora* autoclavado. Também observaram que extrato aquoso não autoclavado promoveu 75% de inibição da germinação de esporos em 25% do extrato e inibição total da formação de apressórios em 15%.



B

Bandas	Aspecto sob luz			MR
	Visível	U.V.		
		365 nm	254 nm	
1	-	-	marrom escuro	0,94
2	amarelo claro	-	marrom claro	0,86
3	amarelo escuro	marrom escuro	marrom escuro	0,83
4	amarelo claro	-	marrom claro	0,78
5	-	marrom escuro	-	0,75
6	-	marrom escuro	marrom escuro	0,64
7	marrom claro	marrom escuro	marrom escuro	0,29

Figura 3. (A) Bioensaio para caracterização de frações fungitóxicas em óleo essencial e extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*. A área clara ao redor das bandas indica inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum sublineolum*. (B) Características das frações obtidas por cromatografia em camada delgada. MR: mobilidade relativa.

Cromatografia em camada delgada

No bioensaio para a detecção de compostos fungitóxicos presentes no óleo essencial e EB, foi possível detectar a presença de frações nas quais houve inibição do desenvolvimento de *C. sublineolum* (Figura 3). A banda 1 na alíquota de óleo essencial visualizada sob luz ultravioleta (254 nm) e uma pequena região na alíquota de extrato bruto, não detectada sob os comprimentos de onda observados, exibiram efeito fungitóxico ao fungo utilizado no experimento.

Silva et al. (10) observaram que frações aceto-etanólica (raízes) e clorofórmica (caule) de *Esenbeckya grandiflora*, uma Rutaceae com referência antimicrobiana, mostraram uma ED 50 > 600 ppm com relação ao crescimento micelial e germinação dos conídios de *Botryodiplodia theobromae* e que a análise de cromatogramas permitiu o isolamento de pelo menos duas substâncias fungitóxicas.

Produção de fitoalexinas em sorgo e soja

Observou-se que o EB induziu o acúmulo de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo (Figura 4). As maiores produções das fitoalexinas deoxiantocianidinas foram promovidas pelo patógeno *C. sublineolum*, seguida da levedura *S. cerevisiae*. Porém, em cotilédones de soja, o EB não induziu o acúmulo de gliceolina, onde a maior indução foi proporcionada por *C. sublineolum* e nos tratamentos com UV e *S. cerevisiae* (Figura 5). Schwan-Estrada et al. (9) trabalhando com extratos de orégano, cardo santo, hortelã, alecrim, mentrasto, babosa, manjerona, erva cidreira, cânfora, pitanga, goiabeira, romã, alfavaca, mil-folhas e poejo, verificaram que estes extratos promoviam a síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em sorgo e da fitoalexina gliceolina em soja. Os autores também observaram que os extratos de romã, erva cidreira, manjerona, babosa e orégano foram mais efetivos na indução de gliceolina, e que os extratos de pitanga, cânfora, poejo, romã e cardo santo foram mais efetivos na indução de deoxiantocianidinas.

Os resultados da síntese de fitoalexinas pelo óleo essencial de *E. citriodora* estão ilustrados na Figura 6. Observou-se, que o óleo essencial, nas concentrações testadas, não promove a

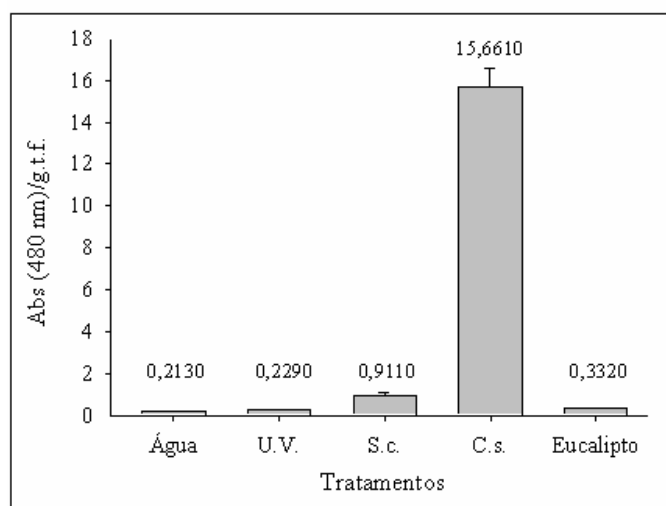


Figura 4. Acúmulo de um complexo de pigmentos em mesocótilos de sorgo tratados com Água destilada (controle); U.V.: Ultravioleta; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; C.s.: *Colletotrichum sublineolum* e extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*. As barras representam o desvio padrão da média de 5 repetições.

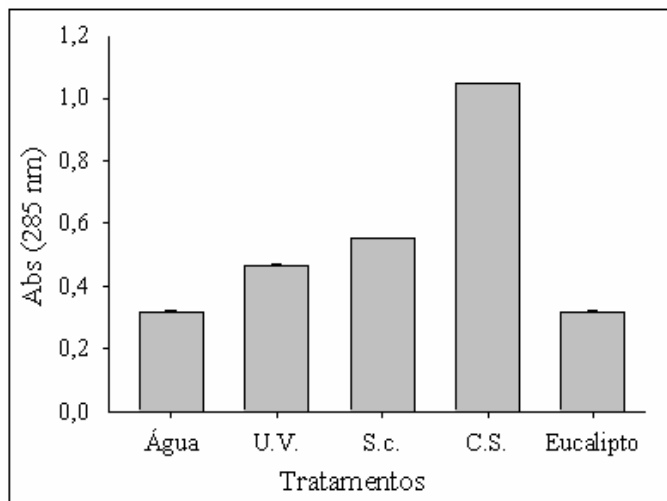


Figura 5. Acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja tratados com Água destilada (controle); U.V.: Ultravioleta; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; C.s.: *Colletotrichum sublineolum* e extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*. As barras representam o desvio padrão da média de 3 repetições.

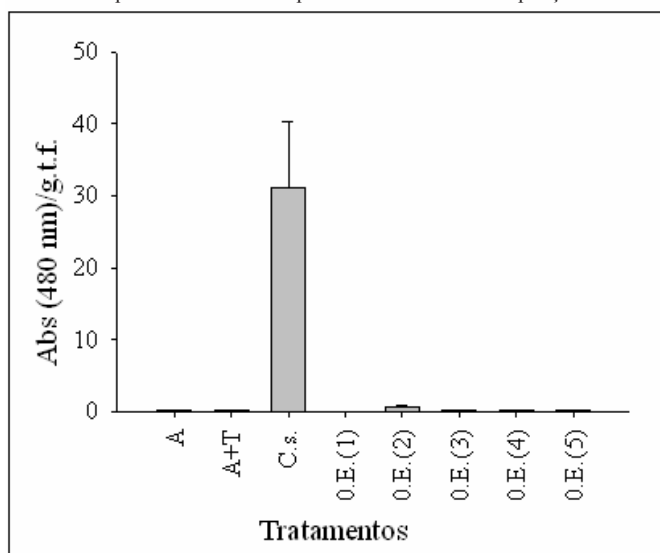


Figura 6. Acúmulo de um complexo de pigmentos em mesocótilos de sorgo tratados com A: água destilada; A+T: água destilada + Tween; C.s.: *Colletotrichum sublineolum*; O.E.(1): óleo essencial 10^{-2} ; O.E.(2): óleo essencial 10^{-4} ; O.E.(3): óleo essencial 10^{-6} ; O.E.(4): óleo essencial 10^{-8} ; O.E.(5): óleo essencial 10^{-10} . As barras representam o desvio padrão da média de 3 repetições.

síntese de fitoalexinas em sorgo. Houve maior acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos tratados com *C. sublineolum*. Provavelmente, a tentativa de nortear o efeito fitotóxico do óleo essencial sobre os mesocótilos de sorgo, através da diluição do mesmo, tenha reduzido a atividade elicitora. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados avaliando-se novas diluições e/ou metodologias para evitar o efeito fitotóxico do óleo essencial sobre estes tecidos.

O presente trabalho evidenciou o potencial de *E. citriodora* na proteção de plantas, seja pelo controle direto de fitopatógenos como *S. rolfsii*, *C. sublineolum* e *Phytophthora* sp., *R. solani* e *A. alternata*, em função do efeito no crescimento micelial, na germinação de esporos ou por atividade fungitóxica; ou pela ativação de mecanismos de defesa como fitoalexinas do deoxiantocianidinas em sorgo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bankole, S.A.; Joda, A.O. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melons seeds (*Colocynthis citrullus* L.). *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, Kenya, v.3, n.1, p.52-59, 2004.
2. Barros, S.T.; Oliveira, N.T.; Maia, L.C. Efeito do extrato de alho (*Alium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinação de conídios de *Curvularia* spp e *Alternaria* spp. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 21, n.2, 1995. (Resumos).
3. Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.; Tessmann, D.; Scapim, C.A Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.29, n.02, p.128-134, 2004.
4. Cunico, M.M.; Cirio, G.M.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Montrucchio, D.P.; Auer, C.G.; Grigoletti Júnior, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Maringá, v.12, n.2, p.69-73, 2002.
5. Fiori, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Vida, J.B.; Scapim, C.A.; Cruz, M.E.S.; Pascholati, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal Phytopathology*, Berlin, v.148, p.483-487, 2000.
6. Gullino M.L.; Kuijpers L.A.M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.32, p.559-579, 1994.
7. Ragsdale, N.N.; Sisler H.D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, California, v.32, p.545-557, 1994.
8. Santos, M.M.F.B.; Pascholati, S.F. Efeito de metabólitos de duas formas de *Lippia alba* sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), isolado *Citrus* sp. 1996. 105p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Piracicaba.
9. Schwan-Estrada, K.R.F.; Cruz, M.E.S., Stangarlin, J.R.; Pascholati, S.F. Efeito do extrato bruto de plantas medicinais na indução de fitoalexinas em soja e sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, supl., p.346-346, 1997. (Resumo).
10. Silva, J.B. da; Conserva, L.M.; Lopez, A.M.Q. Efeito dos extratos aceto-etanólicos (raízes) e clorofórmicos (caule) de *Esenbeckya grandiflora* sobre *Botryodiplodia theobromae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, supl., p.276-276, 1994. (Resumo).
11. Stangarlin, J.R., Schwan-Estrada, K.R.F.; Cruz, M.E.S.; Nozaki, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biociência*, Brasília, v.11, p. 16-21, 1999.