

Cientific Paper

Avaliação *in vivo* do fermentado botânico de *Ilex paraguariensis* frente ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* no cultivo de alface crespa

Resumo

Sclerotinia sclerotiorum é considerado um dos patógenos mais importantes do mundo, pois afeta um vasto número de hospedeiros. O controle deste patógeno nas diversas culturas é limitado em função de sua capacidade de formar estruturas de resistência (escleródios) que garantem sua sobrevivência no solo mesmo em condições desfavoráveis. Assim, o objetivo deste trabalho, foi determinar *in vivo* o efeito do fermentado botânico de *Ilex paraguariensis* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, frente a mortalidade de plântulas de alface cultivadas em vaso. O fermentado botânico foi produzido com 1,5 L de água não tratada e 500 g da planta triturada, a fermentação ocorreu de maneira espontânea, mantendo-se a mistura em ambiente escuro até cessar a fermentação. Após, a calda foi filtrada e misturada com água destilada nas concentrações de 20% e 40%. Os tratamentos utilizados foram T1: somente patógeno; T2: preventivo (5 h antes da inoculação do fungo e somente 1 aplicação); T3: curativo (5h após a inoculação do fungo, aplicação semanal, no período de 3 semanas); T4: somente água. Foram utilizadas 30 plantas para cada tratamento. Depois de 50 dias de experimento, 70% das plantas do T1, morreram. E todas as alfaces (tratadas com 40% do fermentado) tanto do T2, quanto do T3 e T4 se mostraram saudáveis. Foi realizada a pesagem da planta e medido o crescimento radicular das sobreviventes. As alfaces do T2 apresentaram 68 g e 30 cm. No T3, o peso da planta foi de 57 g para concentração 20% e 70 g em 40%. Estes resultados sugerem que o fermentado de *I. paraguariensis* poderão ser utilizados no controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum* da alface e ainda agir como um indutor de crescimento da referida hortaliça.

Palavras-chave: controle alternativo; Sustentabilidade; Antifúngico.

Abstract

***In vivo* evaluation of botanical fermented *Ilex paraguariensis* front of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in curly lettuce cultivation**

Sclerotinia sclerotiorum is considered one of the most important pathogens in the world, because it affects a large number of hosts. The control of this pathogen in different cultures is limited due to its ability to form resistant structures (sclerotia) that guarantee their survival in the soil even in unfavorable conditions. The objective of this work was to determine the *in vivo* effect of *Ilex paraguariensis* botanical fermented on

Received at: 11/05/2017

Accepted for publication at: 04/12/2017

¹ Graduada em Ciências Biológicas. Universidade de Caxias do Sul, Câmpus Dois Vizinhos - UCS - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul - RS, 95070-560. Email: tati_triaca@hotmail.com

² Lic. Ciências Biológicas. MSc. Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Câmpus Dois Vizinhos - UCS - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul - RS, 95070-560. Email: marcia.pansera@ucs.br

³ Graduada em Agronomia. Universidade de Caxias do Sul, Câmpus Dois Vizinhos - UCS - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul - RS, 95070-560. Email: marciaandreolla@gmail.com

⁴ Tecg.º. Agrícola. Universidade de Caxias do Sul, Câmpus Dois Vizinhos - UCS - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul - RS, 95070-560. Email: stventur@gmail.com

⁵ Lic. Ciências Biológicas. Dra. Prof. Pesq. Universidade de Caxias do Sul, Câmpus Dois Vizinhos - UCS - Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul - RS, 95070-560. Email: vcsartor@ucs.br

Sclerotinia sclerotiorum, opposite the death of lettuce seedlings grown in pots. The fermented botanical was produced with 1.5 L of raw water and 500 g of the comminuted plant, fermentation occurred spontaneously by keeping the mixture in a dark environment to stop the fermentation. Then, the slurry was filtered and mixed with distilled water at concentrations of 20% and 40%. The treatments were T1: only pathogen; T2: Preventive (5 h before inoculation of the fungus and only 1 application); T3: Curative (5h after inoculation of the fungus, weekly application 3 weeks); T4: only water. 30 plants were used for each treatment. After 50 days of the experiment, 70% of the T1 plants died. And all lettuces (treated with 40% of fermented) both T2, T3 and T4 as the proved sound. weighing the plant was carried out and measured the root growth of the survivors. Lettuces T2 showed 68 g and 30 cm. At T3, the plant weight was 57 g at 20% concentration and 70 g at 40%. These results suggest that the fermented *I. paraguariensis* may be used in the control of phytopathogenic *S. sclerotiorum* lettuce and also act as a growth inducing said vegetable.

Key words: oomycetes; mycelial growth; fungistatic action; fungicide.

Resumen

Evaluación *in vivo* del fermentado botánico de *Ilex paraguariensis* frente al hongo *Sclerotinia sclerotiorum* en el cultivo de lechuga crespa

Sclerotinia sclerotiorum es considerado uno de los patógenos más importantes del mundo, pues afecta a un vasto número de hospedadores. El control de este patógeno en los diversos cultivos es limitado en función de su capacidad de formar estructuras de resistencia (esclerodios) que garantizan su supervivencia en el suelo, incluso en condiciones desfavorables. Así, el objetivo de este trabajo, fue determinar *in vivo* el efecto del fermentado botánico de *Ilex paraguariensis* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, frente a la mortandad de plántulas de lechuga cultivadas en contenedores. El fermentado botánico fue producido con 1,5 L de agua no tratada y 500 g de la planta triturada, la fermentación ocurrió de manera espontánea, manteniéndose la mezcla en ambiente oscuro hasta que cesó la fermentación. Después, la caldera fue filtrada y mezclada con agua destilada en las concentraciones de 20% y 40%. Los tratamientos utilizados fueron T1: sólo patógeno; T2: preventivo (5 h antes de la inoculación del hongo y sólo 1 aplicación); T3: curativo (5h después de la inoculación del hongo, aplicación semanal, en el período de 3 semanas); T4: sólo agua. Se utilizaron 30 plantas para cada tratamiento. Después de 50 días de experimento, el 70% de las plantas del T1, murieron. Y todas las lechugas (tratadas con 40% del fermentado) tanto del T2, como del T3 y T4 se mostraron sanas. Se realizó el pesaje de la planta y la medición del crecimiento radicular de las sobrevivientes. Las lechugas del T2 presentaron 68 g y 30 cm. En el T3, el peso de la planta fue de 57 g para concentración 20% y 70 g en un 40%. Estos resultados sugieren que el fermentado de *I. paraguariensis* puede ser utilizado en el control del fitopatógeno. *S. sclerotiorum* de la lechuga y aún actuar como un inductor de crecimiento de dicha hortaliza.

Palabras clave: control alternativo; Sostenibilidad; Antifúngico.

Introdução

Sabe-se que os problemas ambientais de hoje são em grande parte consequências dos processos adotados nas práticas agrícolas do decorrer dos anos, e essa homogeneização das relações agroambientais desprezadas pela agricultura convencional, gera grande preocupação com a conservação do ambiente explorado, bem como com sua degradação e contaminação (HORBACH et al., 2011; GERALDINE et al., 2013).

A preservação da produtividade da terra

agrícola em longo prazo requer a produção sustentável de alimentos. A sustentabilidade é alcançada através de práticas agrícolas alternativas, orientadas pelo conhecimento em profundidade dos processos ecológicos que ocorrem nas áreas produtivas e nos contextos mais amplos dos quais elas fazem parte (GLIESSMAN, 2000; CARVALHO et al., 2015).

O manejo e conservação para tornar o desenvolvimento da agricultura sustentável se dá pelo estudo de novas alternativas viáveis reduzindo ou extinguindo o uso de pesticidas

sintéticos (LOUZADA, 2009) e utilizando metabólitos produzidos naturalmente pelas plantas e utilizados em seu benefício para controlar patógenos vindos de algum tipo de desregulação do ambiente, seja ela de influência externa (clima, temperatura, umidade) ou interna, com práticas incorretas de agricultura (MILAN, 2015).

Neste sentido se busca espécies que possuam potencial de metabólitos para controle de doenças e que sejam de fácil obtenção. As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, considerados essenciais à mesma, como as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (SANTOS, 2004), enquanto os metabólitos secundários apresentam distribuição restrita a uma espécie vegetal ou a um grupo 20 de espécies relacionadas, estando intimamente associados às estratégias de defesa das plantas e envolvidos na produção de cor ou aroma que atraem insetos polinizadores ou animais que espalham seus frutos (VALDUGA, 2016). Sendo compostos de elevada diversidade e abundantes no reino vegetal, têm despertado interesse de pesquisadores, os quais vêem nos metabólitos secundários uma fonte promissora de constituintes químicos potencialmente úteis ao homem (LIMA NETO, 2015).

Da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) se produz uma bebida popularmente conhecida como chimarrão, amplamente consumido pela população no Sul do Brasil (HARTMANN et al., 2011). Possui vários constituintes químicos, como os alcalóides metilxantínicos, principalmente a cafeína, substâncias glicosídicas como as saponinas e compostos fenólicos (flavonóides, ácido cafeico e os ácidos clorogênicos) conhecidos pela sua bioatividade (GNOATTO et al., 2007).

A poda da erva-mate gera uma quantidade de resíduos muito significativos, representada pelos galhos que não são aproveitados para produção na indústria, permanecem abandonados na lavoura, podendo ser empregados na elaboração de subprodutos, gerando renda extra ao produtor e ainda reduzindo riscos ocupacionais por acidentes perfuro-cortantes durante as colheitas subsequentes. Este sub-produto pode ser uma rica contribuição para renda dos agricultores e mais importante ainda, matéria prima para elaboração de um produto viável

no tratamento de fitopatógenos.

A alface (*Lactuca sativa* L.) está entre as dez hortaliças mais apreciadas in natura no Brasil (CEASA, 2015; GIL, 2009). Entretanto, esta cultura apresenta várias doenças, dentre as quais destaca-se o mofo branco ou podridão de esclerotínia causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, um patógeno que sobrevive no solo e que infecta mais de 360 espécies de plantas (AMORIN, 2005). Este patógeno pode atacar a planta em qualquer estágio de desenvolvimento, principalmente próxima à colheita e produz estruturas de resistência denominadas escleródios, que tornam a doença de difícil controle em função do longo período de permanência destas no solo (PAVAN e KUROSZAWA, 1997). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar *in vitro* e *in vivo* o efeito do fermentado de *Ilex paraguariensis* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, frente a mortalidade de plântulas de alface cultivadas em vaso.

Metodologia

O microrganismo *Sclerotinia sclerotiorum* (A67/09) foi isolado de alface (*Lactuca sativa*), coletada em Caxias do Sul/Rio Grande do Sul/Brasil.

A coleta da planta *Ilex paraguariensis* (erva mate) foi realizada na localidade de Travessão Aquidabam em Flores da Cunha/Rio Grande do Sul/Brasil, em maio de 2015.

O fermentado botânico da planta foi produzido pela junção de 1,5 L de água não tratada e 500 g de planta fresca, (ramos finos, folhas e flores), liquidificados até ficar triturado. A fermentação ocorreu de maneira espontânea e aeróbica, mantida em ambiente escuro até cessar a fermentação, e agitada uma vez ao dia.

A avaliação *in vitro* da atividade fungitóxica do fermentado botânico sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* ocorreu através da seguinte metodologia: O fermentado foi filtrado e incorporado nas concentrações 20 e 40% em meio BDA (batata-dextrose-ágar), e autoclavado a 121° C por 15 min. Isto foi vertido em placas de petri, em três repetições, e incorporados discos de 3 mm colonizados com o fungo de interesse e outras contendo somente BDA utilizados como controle, ambas permaneceram em Câmara de Germinação BOD durante 14 dias, em fotoperíodo de 12 h, à temperatura de 25° C. O diâmetro micelial do crescimento das colônias foi medido no 3º, 7º e 14º dia após inoculação.

A avaliação *in vivo* da atividade fungitóxica

do fermentado botânico sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* foi realizado da seguinte maneira: Para cada tratamento foram utilizadas 10 plântulas de alface do tipo cressa. As mesmas adquiridas em comércio convencional. Estas foram transplantadas em vasos de 1L contendo substrato do tipo Carrollina, após dez dias do transplante foram iniciados os tratamentos. Os tratamentos utilizados foram T1: somente patógeno; T2: preventivo (5 h antes da inoculação do fungo e somente 1 aplicação); T3: curativo (5 h após a inoculação do fungo, semanalmente no período de 3 semanas); T4: somente água. Para o preparo do inóculo do patógeno foram lavadas placas contendo o referido e inoculados 100 microlitros em cada vaso.

Metodologia de análise de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP18 (5µm) equipado com detector UV a 210nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – água Milli-Q com 1% de ácido fosfórico e solvente B – Acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5 min, 60% de A de 5 a 40 min e 90% de A de 45 a 50 min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min. As amostras foram filtradas em membranas de Nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU*s) do pico do

composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado (ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, rutina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, vitexina, apigenina e canferol).

Resultados e Discussão

Nos testes *in vitro* observando o micélio após 14 dias de incubação verificamos que o mesmo não apresentava crescimento, posteriormente foi feita uma contra prova, retirando o anel inoculado a fim de verificar se o mesmo apenas inibia o crescimento do fungo ou tinha ação fungistática. O anel foi inoculado novamente em meio de cultivo nutriente (BDA) e após 14 dias o mesmo não tinha se desenvolvido, confirmando então que a ação do fermentado realmente levou a supressão do fungo.

Após comprovada sua ação *in vitro*, deu-se início aos testes em casa de vegetação, as plantas foram avaliadas visulamente duas vezes por semana quanto a coloração e crescimento, sendo regadas todos os dias na parte da manhã, com água proveniente de fonte da própria universidade, sem adição de nenhum nutriente. Após o período de 50 dias as mesmas foram colhidas para avaliação. Na tabela 1 é demonstrado o crescimento radicular, em uma média das plantas que sobreviveram ao tratamento demonstrado que ambos tratamentos, não tiveram diferença significativa entre si. Ambos apresentaram um crescimento radicular satisfatório. Exceto o controle com patógeno onde as plantas não apresentaram crescimento, ficando estagnadas na medida da radícula das mudas transplantadas.

Tabela 1. Média do comprimento das raízes, nos diferentes tratamentos utilizados (T1: somente patógeno; T2: preventivo; T3: curativo; T4: somente água).

T1	Radícula (cm)				T4
	T2		T3		
	Concentrações		Concentrações		
	20%	40%	20%	40%	
4,69c	29,56ab	32,72a	19,23b	25,28ab	30,07ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na tabela 2 houve uma promoção no peso da parte aérea + raiz nos tratamentos com os fermentados, apresentando melhor desempenho em T2, ambas concentrações e T3 a 40% se comparados ao controle somente com água, vale ressaltar que as plantas encontravam-se em solo estéril. Desta

forma os fermentados botânicos demonstram que além de impedir o crescimento dos fungos, ainda colaboram com o desenvolvimento da plântula. Como cita Schwan-Estrada (2003), os metabólitos secundários de diferentes espécies da flora, agem em combate a patógenos de plantas tanto por ação

fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos de caráter eliciador.

Tabela 2. Peso total das plantas, folhas e raízes nos tratamentos (T1: somente patógeno; T2: preventivo; T3: curativo; T4: somente água).

Peso total da Plântula (g)					
T1	T2		T3		T4
	Concentrações		Concentrações		
	20%	40%	20%	40%	
2,50c	80a	82a	50b	73a	57b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os sintomas causados por *S. sclerotiorum* são murchas das plantas, tombamento, escurecimento da região do colo da planta e podridão de raízes. As partes afetadas podem exibir um micélio branco de aspecto cotonoso, junto à superfície do solo. Com o avanço da doença, observa-se a formação dos escleródios, responsáveis pela disseminação da doença, que são esféricos (2 mm de diâmetro), rígidos, inicialmente de coloração branca, e, posteriormente, tornam-se marrons (INSTITUTO BIOLÓGICO, 2015). Os escleródios desempenham papel importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, pois sob condições favoráveis e na presença de um hospedeiro suscetível, o escleródio germina e produz micélio (germinação miceliogênica), que penetra diretamente nos tecidos da base da planta, ou forma apotécios (germinação carpogênica), que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos, infectando o hospedeiro (LEITE, 2005; IZABELLA, 2010). Os testes realizados *in vivo* demonstraram que o isolado de *S. sclerotiorum* foi altamente patogênico em alface, tendo reduzido significativamente a percentagem de plântulas sobreviventes, o comprimento do hipocótilo e da radícula em T1.

Na tabela 3 é demonstrada a atividade do fermentado frente a mortalidade das plantas. Como cita Stangarlin (1999), compostos secundários presentes em plantas podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, através da ação antimicrobiana direta, ou ativando

mecanismos de defesa das plantas que venham a ser tratada com estes compostos (DUTRA, 2010). Kubo et al., (1993) comprovaram a atividade antimicrobiana de *Ilex paraguariensis* frente a bactérias e fungos patogênicos, dentre as bactérias que sofreram inibição total encontram-se *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Gonsalves (2005) cita que o extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* apresentou amplitude na inibição do crescimento dos microorganismos *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. No presente trabalho o fermentado de *Ilex*, apresentou controle do patógeno na proporção de 100% em ambos tratamentos em sua maior concentração; em ambos tratamentos não foram observados escleródios, exeto em T1 onde foram observados tanto nas plantas que sofreram ação letal do fungo quanto nas que sobreviveram ao ataque porém sem se desenvolver. O fungo *S. sclerotiorum* forma estruturas de resistência chamadas escleródios, que podem sobreviver no solo por vários anos na ausência de hospedeiros ou em condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento (COLEY-SMITH e COOKE 1971; TRONCO, 2015). Os escleródios desempenham papel muito importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, visto que são precursores dos apotécios, onde são formados os ascósporos que, em condições ideais, podem infectar as plantas hospedeiras (HUINTER et al., 1978; RODRIGUES, 2007).

Tabela 3. Letalidade do patógeno após 50 dias (T1: somente patógeno; T2: preventivo; T3: curativo; T4: somente água).

Mortalidade das plântulas (%)					
T1	T2		T3		T4
	Concentrações		Concentrações		
	20%	40%	20%	40%	
70a	10b	0c	30b	10b	0c

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo De Souza et al. (2011) estão presentes no *I. Paraguariensis*, os flavonóides rutina, canferol, quercetina e glicosídeos de quercetina. No presente trabalho verificou-se se estavam presentes os mesmos metabólitos visto que alguns fatores podem influenciar na sua presença. A literatura cita que existe uma correlação positiva já estabelecida da luminosidade que a planta é submetida com a produção de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (TATTINI et al., 2004). Este fato é explicado pela proteção contra a foto-destruição que estes metabólitos proporcionam ao absorver e/ou dissipar a energia solar, agindo assim como uma barreira, evitando danos aos tecidos mais internos pela radiação UV-B (280-320nm). Isto acontece porque os flavonoides estão acumulados principalmente na epiderme e camadas adjacentes, pêlos, cutícula e material epicuticular, sendo dessa forma, utilizados pelos vegetais como filtros UV-B, absorvendo esta radiação, sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (BIEZA, 2001). Rachwal et al., (2000), encontraram uma diminuição de dez por cento nos teores de compostos fenólicos com uma redução de 38% na intensidade luminosa. De acordo com os autores, a quantidade de compostos fenólicos na erva-mate diminui com o aumento do sombreamento.

Diversos autores, avaliando diferentes espécies vegetais, já demonstraram também a influência da idade e desenvolvimento da planta na quantidade total de metabólitos produzidos, bem como nas proporções relativas destes constituintes

químicos (BOWERS, 2003). Bubols et al. (2013) afirma que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, como é o caso dos ácidos fenólicos e flavonóides.

Foram analisados alguns padrões de compostos fenólicos, como Rutina, Quercetina, Resveratrol, Ácido Ferrulico, Hesperidina, Catequina, Epicatequina, Apigenina, Miricetina, Ácido Gálico, Canferol e Vitexitina. Sendo que o Fermentado de *Ilex* apresentou apenas o composto rutina na concentração de 14,96 mg /mL. Apesar de Filip (2001) salientar que este metabólito encontra-se em baixas quantidades percentuais nas folhas de erva-mate. No presente estudo não foram observados outros padrões fenólicos.

Conclusão

Tanto o tratamento preventivo quanto o curativo apresentaram eficiência no controle do fitopatógenos. Na concentração de 40% a eficiência foi total.

Ambos tratamento a 40% apresentaram melhores resultados, se considerado o tamanho e desenvolvimento das plantas, se comparado a testemunha água. Isto nos induz pensar que o fermentado possui propriedades que induzem o crescimento destas plantas.

No solo tratado com fermentado não foram encontradas estruturas de resistência (escleródios), já no T1 encontramos 0,05 escleródios por grama de solo.

Referências

- AMORIN, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed Agronômica Ceres, 2005. v.1, cap.13, 246-267 p.
- BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ed **Agronômica Ceres**, 1997. v.2, cap. 4, p.18-25.
- BIEZA, K.; LOIS, R. An Arabidopsis Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1105-1115, 2001.
- BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v. 74, p. 1778-1791, 2003.
- BUBOLS, G. B. et al. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13, n.3, p. 318-334, 2013.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 50, n. 12, p. 1220-1224, 2015.
- CEASA-PARANÁ. Disponível em: < www.ceasa.paraná > Acesso em: 30/04/2015.

COLEY-SMITH, J. R.; R. C. COOKE. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto. California. v. 9, p. 65-92, 1971.

DE SOUZA L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307– 7315, 2011.

DUTRA, F. L. G.; RIBANI, R. H. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Química Nova**, 2010, v. 33, n.1, p.119-123.

FILIP, R.. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72 (7), p. 774-778, 2001.

GERALDINE, A. M. et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, San Diego, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.

GIL, R; SMITH, A.; CHAVES, B.; WYCKHUYS, K.; FORERO, C. AND JIMÉNEZ, J. Combined efficacy assessment of soil solarization and bio-fungicides for management of *Sclerotinia* spp. in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Agronomía Colombiana**, v. 27, n. 2), p. 193-201, 2009.

GLIESSMAN, STEPHEN R. **Perturbação, sucessão e manejo do agroecossistema. Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Tradução: Maria José Guazzelli. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 2000, 40-54 p.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 304-307, 2007.

GONÇALVES, A.L.; A. ALVES FILHO, H. MENEZES. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; JUNIOR DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th. ed. New Jersey: Englewood, 2011, 900 p.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, K. M.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de ervamate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.1, p. 113-119, jan. 2011.

HUNTER, J.E.; G.S. ABAWI & D.C. CROISER. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. **Plant Disease Report**, v. 62, n. 7, p. 633-637. 1978.

INSTITUTO BIOLÓGICO. Disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/> Acessado em 11 de julho de 2015.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695-999, 2010.

TRONCO, K. M. Q.; BISOGNIN, D. A.; FLEIG, F. D.; HORBACH, M. A. Enraizamento in vitro e aclimatização de microestacas de *Ilex paraguariensis* A. St Hil. **Cerne**, v. 21, n. 3, p. 371-378, 2015.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. **Journal Agricultural Food Chemicals**, v.41, n.1, p.107-11, 1993.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja**, 2005. 3 p. (Comunicado Técnico 76).

LIMA NETO, G.A.1; KAFFASHI, S.1; LUIZ, W.T.1; FERREIRA, W.R.1; DIAS DA SILVA, Y.S.A.1; PAZIN, G.V.1; VIOLANTE, I.M.P.1. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

LOUZADA, G. A. S. et al. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

MILAN, M.D.; BARROSO, F.M; MELLO, S.C.M; ARAÚJO, M.S.; CARVALHO, D.D.C. Regimes de luz na produção de conídios de *Trichoderma harzianum* para controle do mofo branco em feijoeiro. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 45, n. 4, p. 434-439, out./dez. 2015.

- PAVAN, M.A.; KUROSZAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; AMORIN, L. Sobrevivência do inóculo. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed Agronômica Ceres, 2005. v.1, cap.13, 246-267 p.
- RACHWAL, M. F. G. et al. Influência da luminosidade sobre os teores de macronutrientes e tanino em folhas de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) In: II CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE E III REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE. Anais Porto Alegre: UFRGS/ FEPAGRO/ ACI Encantado/ Prefeitura de Encantado-RS, 2000.
- RODRIGUES, R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 124-128, 2007.
- SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabólicos secundários**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 2º ed. Editora Universidade/UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2004. p. 403- 434.
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.554-556, 2003.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de doenças de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.11, p.16-21, 1999.
- TATTINI, M. et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v.163, n.3, p. 547-561, 2004.
- VALDUGA, A. T.; GONÇALVES, I.L.; DARTORA, N.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; SOUZA, L.M. Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies Perfil fitoquímico de progenies de erva-mate morfologicamente selecionadas. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 40, n.1, p.114-120, 2016.