

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL

BEATRIZ SANTOS MEIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PREVENÇÃO DE *COWPEA APHID-
BORN MOSAIC VIRUS*, EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO
AMARELO, CULTIVAR 275, TRATADAS COM *CALCAREA
CARBONICA* E *SILICEA TERRA***

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
2016

BEATRIZ SANTOS MEIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PREVENÇÃO DE COWPEA APHID-
BORN MOSAIC VIRUS, EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO
AMARELO, CULTIVAR 275, TRATADAS COM CALCAREA
CARBONICA E SILICEA TERRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia - Mestrado Profissional, do Departamento de Agronomia, da Universidade Estadual de Maringá como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Área de Concentração: Agroecologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M414a Meira, Beatriz Santos
Atividade enzimática e prevenção de *Cowpea Aphid-
Born Mosaic Virus*, em mudas de maracujazeiro
amarelo, cultivar 275, tratadas com calcarea
carbonica e silicea terra / Beatriz Santos Meira --
Maringá, 2016.
70 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Katia Regina Freitas
Schwan-Estrada.
Dissertação (mestrado profissional) - Universidade
Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação
em Agroecologia - Área de Concentração:
Agroecologia, 2016.

1. Patógeno 2. Homeopatia. 3. Enzimas. 4.
Mozaico. I. Schwan-Estrada, Katia Regina Freitas,
orient. II. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Agrárias. Departamento de
Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia
- Área de Concentração - Agroecologia. III. Título.

CDD 21.ed. 631.847

AHS

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão primeiramente a Deus, que me impulsionou e me deu força durante todos os momentos de mais esta caminhada.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade.

À Professora doutora Kátia Schwan-Estrada, minha orientadora, peça fundamental para que pudesse concluir este trabalho, que acreditou em mim e me ajudou muito. Obrigado por me “emprestar” sua maravilhosa equipe, Virilene, Davi, Jessica, Larisse, Camila, Lorrana, Paulo e Antônio Jussie, pessoal super competente que não mediram esforços e contribuíram muito com meu aprendizado.

A todos os professores que já passaram por meu caminho acadêmico e que de alguma forma contribuíram com a pessoa e profissional que me tornei. Em especial, aos professores do MPA que tanto contribuíram muito com meus conhecimentos e possibilitaram esta Dissertação.

Aos meus pais, Idelson e Sirlei, que sempre me incentivaram, apoiaram e não desistiram de mim em momento algum.

Ao meu marido, Jeorge, e à minha filha, Maria Rita, pela paciência, compreensão e companheirismo. Obrigada por pela companhia durante as minhas dificuldades, quando as lágrimas caíram e quando meu rosto eram só sorrisos. Obrigada por se manterem sempre firmes ao meu lado.

Aos meus irmãos, Lucas e Idelson, que me aguentaram na casa deles, por mais de um ano e que, apesar de todas as dificuldades, jamais deixaram de me oferecer uma palavra de ânimo e um colchão pra dormir.

Não poderia deixar de agradecer à Maria Helena, minha melhor amiga, mãezinha, fiel escudeira, mulher de muita garra e que sempre tem algum ensinamento, nos momentos mais difíceis. Que me auxiliou muito neste trabalho, que não mediu esforços para chegarmos até aqui. Pelos momentos de alegria que passamos juntas em mais esta empreitada e que, muitas vezes, mesmo sem dinheiro, ríamos muito, pois sabíamos que tudo isso valia a pena e que em tudo devemos dar graças a Deus.

Em especial, a um grande amigo, o Hélio, que conheci no primeiro dia de curso e que me ajudou muito nesta caminhada de Mestrado, cuidando do meu experimento nos dias em que não podia estar presente, cuidando deste trabalho com todo carinho e dedicação. A você

Hélio, meu muito obrigado, qualquer que seja meu agradecimento, este ainda será pouco pela ajuda que você me deu.

Aos meus companheiros de serviço, Darci, Anderson e José Gonçalves, que foram sempre compreensíveis e não me deixaram desistir.

Ao estagiário Allan, que contribuiu com seus serviços no momento de instalação do experimento.

Aos meus amigos, Renan, Valdelice e Cidinha, que foram super compreensíveis em todos os momentos, nos dias que não fui no “voleizão”, por estar escrevendo, nos fins de semana que não podia sair de casa por estar escrevendo e nas vezes que chorei por ter que estar escrevendo. À Odete, amiga que por tantos sábados cuidou da minha filha, enquanto eu estudava e me dedicava às tarefas do Mestrado.

“Em tudo dai graças...”

I Tess 5:

Atividade enzimática e prevenção de *Cowpea aphid-born mosaic virus*, em mudas de maracujazeiro amarelo, cultivar 275, tratadas com *Calcarea carbonica* e *Silicea terra*

RESUMO

O objetivo neste trabalho foi verificar se dinamizações homeopáticas de *Calcarea carbonica* e *Silicea terra* podem reduzir a severidade de *Cowpea aphid-born mosaic virus* (CABMV) em mudas de maracujazeiro. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, *campus* de Maringá-PR, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela foi constituída por três vasos, cada um com uma planta. Os medicamentos homeopáticos utilizados no experimento foram *C. carbonica* e *S. terra*, nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. Os parâmetros avaliados foram o índice de crescimento diário das plantas, teor de clorofila a, b e total, severidade da doença e análise enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e fitoalexinas. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os efeitos significativos do teste F foram comparados pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, visando à comparação das médias entre os tratamentos. Os tratamentos com dinamizações de *C. carbonica* não diferiram entre si, ao avaliar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) do CABMV e não reduziram o índice de crescimento de planta. Os medicamentos homeopáticos de *C. carbonica* em 12CH e 24CH promoveram redução da quantidade de clorofila a (25% para ambas as dinamizações), onde também houve a redução da clorofila total ao aplicar as dinamizações 12CH e 24CH. *C. carbonica* reduziu a atividade específica da catalase e peroxidase comparado à testemunha. Polifenoloxidase não foi influenciada pela aplicação dos tratamentos, enquanto fenilalanina amônia-liase foi reduzida nas dinamizações de 12CH e 60CH comparado à testemunha. Para as fitoalexinas, deoxiantocianidina e faseolina a *C. carbonica* não causou nenhum efeito na indução. Já para a gliceolina, houve indução na produção na dinamização calculada de 35,5CH. Neste parâmetro, *Silicea terra* 60CH causou redução na AACPD do CABMV em 22%, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos 24CH e 30CH. A dinamização 60CH também causou redução em 50% na atividade das enzimas catalase. Para peroxidase, observou-se aumento da atividade específica em 17% ao aplicar a dinamização 12CH. A atividade de polifenoloxidase foi influenciada pela aplicação do tratamento 24CH, aumentando a atividade em 22%, comparado à testemunha, e a atividade da fenilalanina

amônia-liase foi reduzida ao aplicar a dinamização 30CH. Houve acúmulo de deoxiantocianidina e de gliceolina pelas dinamizações utilizadas de *S. terra*. O teor de clorofila não foi influenciado por nenhuma das dinamizações. O parâmetro altura de planta sofreu incremento ao se aplicar a dinamização 30CH, porém 24CH causou redução. Para o número de folhas, as dinamizações 12CH e 24CH causaram redução neste parâmetro.

Palavras-chave: Patógenos; homeopatia; enzimas; mosaico.

Enzymatic activity and prevention of Cowpea aphid-born mosaic virus, in yellow passion fruit seedlings, cultivar 275, treated with *Calcarea carbonica* and *Silicea terra*

ABSTRACT

The aim of this work was to verify if homeopathic dynamizations of *Calcarea carbonica* and *Silicea terra* could reduce the severity of Cowpea aphid-born mosaic virus (CABMV) in passion fruit seedlings. The experiment was conducted in the greenhouse of the Department of Agronomy of the State University of Maringá - UEM, in the campus of Maringá-PR, in a completely randomized design (CRD), with 9 treatments and 5 repetitions. Each plot consisted of three pots, each with one plant. The homeopathic medicines used in the experiment were *C. carbonica* and *S. terra*, in the dynamics of 12CH, 24CH, 30CH and 60CH. The parameters evaluated were daily growth index of plants, chlorophyll a, b and total content, disease severity and enzymatic analysis of peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase and phytoalexins. The results were submitted to a variance analysis and the significant effects of the F test were compared by the Duncan test, with a probability of 5%, aiming to compare the means between the treatments. *C. carbonica* dynamization treatments did not differ among them, when evaluating the area under disease progress curve (AUDPC) of the CABMV and did not reduce the plant growth index. The homeopathic medicaments of *C. carbonica* in 12CH and 24CH promoted a reduction for chlorophyll a (25% for both dynamizations), where there was also the reduction of total chlorophyll by applying the 12CH and 24CH dynamizations. *C. carbonica* reduced the specific activity of catalase and peroxidase compared to control. The polyphenoloxidase was not influenced by the application of the treatments, while phenylalanine ammonia-lyase was reduced in the dynamics of 12CH and 60CH compared to the control. For phytoalexins, deoxyanthocyanidin and phaseolin the *C. carbonica* had no effect on induction. For the glyceolin, there was an induction in the production in the 35.5CH dynamization. In this parameter, *S. terra* 60CH caused a reduction on AUDPC of CABMV by 22%, but did not differ statistically from the 24CH and 30CH treatments. 60CH dynamization also caused a 50% reduction in catalase enzyme activity. For peroxidase, specific activity increase was observed in 17% when applying 12CH dynamization. Polyphenoloxidase activity was influenced by the application of 24CH treatment, increasing the activity by 22% compared to control, and the activity of phenylalanine ammonia-lyase was reduced by applying the 30CH dynamization. There was an accumulation of d deoxyanthocyanidin and glyceolin by the

dynamics used in *S. terra*. The chlorophyll content was not influenced by any of the dynamizations. The plant height parameter increased when the 30CH dynamization was applied, but 24CH caused a reduction. As for number of leaves, the dynamics 12CH and 24CH caused reduction in this parameter.

Keywords: Pathogens, homeopathy, enzymes, mosaic.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Clorofila *a*, *b* e Total em função da aplicação de dinamizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.31

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Teor de Clorofila *a*, *b* e Total em função da aplicação de dinamizações de *Siliceo terra* em plântulas de maracujazeiro.....48

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Escala de notas adaptada para avaliação da presença e severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NOVAES e REZENDE, 1999).22
- Figura 2** - Área abaixo da curva de progresso da doença causada por *Cowpea aphid-born mosaic virus* em função da aplicação de dinâmizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.....27
- Figura 3** - Atividade específica de catalase em folhas em função das aplicações das dinâmizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.....29
- Figura 4** - Atividade específica de peroxidase do guaiacol em folhas em função das aplicações das dinâmizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.....29
- Figura 5** - Atividade específica de polifenoloxidase em folhas em função das aplicações das dinâmizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.....30
- Figura 6** - Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em folhas em função das aplicações das dinâmizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro.....30
- Figura 7** - Acúmulo de gliceolina em função e diferentes dinâmizações de *Calcareo carbonica*. ASM= acibenzolar- S- metil.30
- Figura 8** - Efeito de *calcareo carbonica* em diferentes dinâmizações na altura de plantas e número de folhas (NF) em plantas de maracujazeiro amarelo.32

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Escala de notas adaptada para avaliação da presença e severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NOVAES e REZENDE, 1999).45
- Figura 2** - Área abaixo da curva de progresso da doença causada por *Cowpea aphid-born mosaic virus* em função da aplicação de dinâmizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro.....50
- Figura 3** - Atividade específica de catalase em folhas em função das aplicações das dinâmizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro.51

Figura 4 - Atividade específica de peroxidase do guaiacol em folhas em função das aplicações das dinamizações de <i>Silicea terra</i> em plântulas de maracujazeiro.....	52
Figura 5 - Atividade específica de catalase polifenoloxidase em folhas em função das aplicações das dinamizações de <i>Silicea terra</i> em plântulas de maracujazeiro.....	52
Figura 6 - Atividade específica de <u>fenilalanina</u> amônia-liase em folhas em função das aplicações das dinamizações de <i>Silicea terra</i> em plântulas de maracujazeiro.	53
Figura 7 - Indução de deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo tratados com diferentes dinamizações homeopáticas de <i>Silicia terra</i> . ASM= acibenzolar-S-metil.....	54
Figura 8 - Indução de gliceolina em cotilédones de soja tratados com diferentes dinamizações homeopáticas de <i>Silicia terra</i> . ASM= acibenzolar-S-metil.....	54
Figuras 9 - Parâmetros biométricos de altura de plantas e número de folhas em plantas de maracujazeiro tratadas com <i>Silicea terra</i>	56

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Cultura do maracujá	3
2.2. Doenças do maracujá - CABMV	4
2.3. Homeopatia e agroecologia	4
2.4. Homeopatia na agricultura	6
2.5. Indução de resistência	7
2.5.1. Catalase	7
2.5.2. Peroxidase	8
2.5.3. Polifenoloxidase	8
2.5.4. Fenilalanina amônia-liase.....	9
2.6. Fitoalexinas.....	9
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPITULO 1 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PREVENÇÃO DE COWPEA APHID- BORN MOSAIC VIRUS, EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO CULTIVAR 275, TRATADAS COM CALCAREA CARBONICA.	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2.MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Condução do experimento.....	21
2.1.1. Atividade enzimática.....	22
2.1.2. Fitoalexinas	24
2.1.3. Determinação do teor de clorofila.....	25
2.2. Parâmetros biométricos: altura de plantas e número de folhas	26
2.3. Análises estatística	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4. CONCLUSÃO.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	33

CAPITULO 2 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PREVENÇÃO DE COWPEA APHID- BORN MOSAIC VIRUS, EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO, CULTIVAR 275, TRATADAS COM SILICEA TERRA.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Condução do experimento.....	41
2.1.1. Atividade enzimática.....	42
2.1.2. Fitoalexinas	44
2.1.3. Determinação do teor de clorofila.....	45
2.2. Parâmetros biométricos: altura de plantas e número de folhas	46
2.3. Análises estatística	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4. CONCLUSÃO.....	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO GERAL

O maracujazeiro é originário da América Tropical, com mais de 150 espécies nativas do Brasil (JUNIOR et al., 2000), porém com poucas passifloráceas utilizadas para consumo humano. As espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), o maracujá-roxo (*P. edulis*) e o maracujá-doce (*P. alata*). O maracujá amarelo é o mais cultivado e uma cultura com longo período de safra, permitindo um fluxo equilibrado de renda mensal (MELETTI, 2011). No Brasil, 27 estados produzem maracujá, sendo a Bahia e o Ceará os maiores produtores. Em 2015, o IBGE colocou o Paraná na nona posição na escala de produção com um total de 838.244 toneladas da fruta em quase 58 mil hectares produzidos no Brasil e rendimento médio de 14,63 toneladas por hectare.

Em 2003, a Secretaria Estadual de Abastecimento (SEAB) apontava a Região Centro-Oeste como a principal produtora de maracujá do Paraná. Entretanto, esta produção vem sendo afetada em função de doenças que ocorrem na cultura.

Entre os patógenos que podem causar prejuízos na cultura do maracujá pode-se citar *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e o vírus *Passion fruit woodiness* vírus – PWV (KIMATI et al., 1997). Após estudos, descobriu-se que a maioria dos isolados de vírus que atacam o maracujazeiro são mais próximos do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV, que do o vírus PWV (NASCIMENTO et al., 2004).

A infecção dos pomares pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) se dá usualmente através da picada de prova de alguns afídeos, como *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis fabae* Scopoli, *Toxoptera citricidus* Kilkaldy, *Uroleucom ambrosiae*, *U. sonchi* e *Myzus nicotianae* Blackman (NARITA 2007). Após a infecção, as plantas sintomáticas podem apresentar sintomas de mosaico no limbo foliar, deformação de folhas, enrugamento e, em casos mais severos, espessamento do pericarpo e o endurecimento do fruto que afeta diretamente a comercialização e a geração de renda de diversos agricultores familiares (NARITA 2007).

Portanto, o desenvolvimento de pesquisas que possibilitem a permanência da cultura do maracujazeiro em regiões produtoras é uma proposta plausível, uma vez que esta cultura é a principal fonte de geração de renda de agricultores familiares e cooperativas de agricultores familiares.

O objetivo neste trabalho foi verificar, em experimento em casa de vegetação, se *Calcareo carbonica* e *Siliceo terra* podem contribuir para o controle do vírus CABMV em plântulas de maracujazeiro e observar se ocorrerá ativação de mecanismo de defesa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do maracujá

O maracujazeiro é originário da América tropical e se adapta muito bem às condições climáticas do Brasil. Seu cultivo no país iniciou-se por volta de 1970 e, no Paraná, expandiu-se em 1980, principalmente no litoral do estado. Hoje, já se encontram lavouras comerciais em diversas regiões do estado (IAPAR, 2015).

De acordo com o Departamento de Economia Rural – DERAL, a área paranaense aumentou 66% de 2004 a 2014, com um incremento de 83% da produção, chegando a produzir 19.600 toneladas no ano de 2014 em uma área de 1318 hectares.

Por ser uma cultura sensível ao frio e a severas geadas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Meio Ambiente definiu um zoneamento agrícola para a cultura no estado do Paraná. Com objetivo de estabelecer um período de plantio mais seguro para a cultura, estabeleceu, para as regiões com risco inferior a 20%, plantio no período de agosto a março e, para aquelas com risco entre 20% e 40%, plantio para os meses de agosto a outubro (CARVALHO et al., 2015).

O maracujá possui ciclo relativamente rápido, adaptando-se principalmente a pequenas propriedades, de regime familiar, em áreas de 1 a 4 hectares, tornando-se, assim, de grande importância econômica e social para os agricultores familiares e diversos municípios do Paraná (IAPAR, 2015).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, de crescimento vigoroso e contínuo, com exceção para a região sul e outras regiões frias. O crescimento é mais lento até a chegada do ramo principal no arame de sustentação, período pode levar até 90 dias, dependendo das condições climáticas. Após este período, o crescimento intensifica-se, ocorrendo o aparecimento de ramos produtivos, flores e frutos. O desenvolvimento do fruto é muito rápido, sendo intenso até o 20º dia após a fecundação, variando entre 50 a 90 dias para a completa maturação. Podem ocorrer ciclos alternados de vegetação, de floração e pegamento de fruto (VASCONCELOS e FILHO 2000).

Esta alternância de ciclos numa mesma planta possibilita o aparecimento de diversos problemas fitossanitários, que acabam por encarecer a produção, reduzir a qualidade e a produtividade dos pomares (NARITA, 2007).

2.2. Doenças do maracujá - CABMV

Entre os problemas fitossanitários que mais afetam a cultura, a literatura cita a bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv *passiflorae*), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), a verrugose (*Cladosporium herbarum*) e a virose PWV *Passion fruit woodiness virus* como as principais doenças do maracujazeiro (KIMATI et al., 1997).

Kimati et al. (1997) relataram que, a partir de 1970, ocorreram os primeiros diagnósticos de PWV no Brasil e acreditava-se que os sintomas de endurecimento e mosaico estavam ligados a este vírus. Porém, Nascimento et al. (2004) comprovaram, por meio de estudos de análise da sequência de aminoácidos da proteína capsidal, que a maioria dos isolados estão mais próximos do *Cowpea aphid-born mosaic virus* (CABMV) do que com o vírus PWV. Narita (2007) descreve os sintomas do CABMV como aparecimento de mosaico, clareamento das nervuras, rugosidade, distorções, causando, nos frutos, endurecimento e espessamento do pericarpo.

A transmissão ocorre de forma não persistente por insetos vetores da família *Aphididae* e também por enxertia. Em condições experimentais, pode ser transmitido mecanicamente por extrato de folhas infectadas (ANJOS et al., 2001). Di Piero et al. (2006), em experimentos em casa de vegetação, observaram que, na falta de hospedeiro ideal, o afídeo *Aphis gossypii* Glover pode colonizar lavouras de maracujazeiro. Zerbini Jr e Maciel-Zambolim (1999) ressaltam que a transmissão também pode ocorrer pelo uso de ferramentas contaminadas e ainda por contato entre folhas.

Até o momento, existem apenas medidas preventivas de controle para a virose CABMV, como alternativas de manejo, aquisição de mudas sadias produzida em viveiros idôneos, plantio das mudas a aproximadamente 2 metros de altura, além de medidas de erradicação ao realizar o rouging de plantas com sintomas (NARITA, 2007).

2.3. Homeopatia e agroecologia

Inicialmente, a homeopatia foi desenvolvida pelo médico alemão Samuel Christian Frederick Hahnemann, no ano de 1796, como alternativa para tratamento de doenças humanas (ROSSI, 2005). O médico, porém, não estava satisfeito com as metodologias aplicadas na medicina, por isso, passou a traduzir livros, dentre os quais estava a *Matéria Médica* do médico escocês Willian Cullen, o qual atribuía à quina efeito tônico a pacientes enfermos por malária. Assim, passou a realizar testes em si mesmo, concluindo que a quina causa febre semelhante à da malária, quando aplicada em pacientes saudáveis (RISSATO et al., 2016).

Através de testes neste sentido, Hahnemann pode compreender que o “Semelhante cura o semelhante”, tornando esta premissa básica desta ciência.

A maior parte dos estudos com a homeopatia foi realizado em seres humanos, buscando encontrar alternativas de tratamentos para as enfermidades, levando em consideração também a dieta alimentar, o clima, os fatores ecológicos, psicológicos e principalmente a energia vital (ROSSI, 2005).

Durante os estudos com a homeopatia, Hahnemann pode notar que alguns medicamentos podiam ser tóxicos aos pacientes e, assim, resolveu diluí-los, buscando reduzir este efeito, mas, com a diluição, houve também redução na eficácia do medicamento. Neste momento, ele descobriu que a energia cinética poderia ser uma aliada à homeopatia e, através da sucussão, aperfeiçoar a eficiência do produto. Nascia então a dinamização (RISSATO et al., 2016).

Esta dinamização significa a quantidade de vezes que o medicamento foi sucussionado, sendo expresso com o número de sucussão seguido por uma letra, que indica a forma como foi preparado (Rossi, 2005), por exemplo, 20CH (20 = sucção e CH = centesimal hahnemaniana).

Como aliada à agricultura familiar, Rossi (2005) defende a agroecologia como ciência e alternativa para viabilizar a atividade e torná-la rentável e sustentável em todos os âmbitos.

Para Caporal e Costabeber (2004), a agroecologia é um novo tipo de enfoque que pode contribuir para a transição da agricultura convencional, para modelos menos agressivos ao ambiente e aos seres vivos. Trata-se de uma ciência a ser construída e juntamente com outras ciências busca alcançar uma agricultura de menor impacto. Para Rossi (2005), a agroecologia é uma ferramenta que possibilita a produção de alimentos seguros e que, quando adotadas técnicas inovadoras e de manejo, pode-se produzir contaminação do meio ambiente e do próprio alimento.

A agroecologia vem ao encontro da homeopatia, pois esta ciência é caracterizada por analisar um organismo como um todo, sendo uma ferramenta importantíssima para amenizar os desequilíbrios presentes, sejam eles em humanos, animais ou em plantas (BONATO, 2014).

2.4. Homeopatia na agricultura

Os primeiros relatos de experimentos com medicamentos homeopáticos realizados na área agrícola remetem a 1920 e ocorreram em um laboratório da Alemanha, o Instituto de Biologia em Stuttgart, chegando ao Brasil, apenas em 1980 (ANDRADE E CASALI, 2011).

Os medicamentos homeopáticos (ou soluções ultra diluídas) podem tornar-se promissores e impactantes do ponto de vista de controle preventivo, como um bioproduto ativador de resistência a doenças de plantas, indicando assim nova opção para o manejo de doenças, tornando-se parte do desenvolvimento sustentável, conciliando as necessidades econômicas e sociais da população humana, com a preservação ambiental e qualidade de vida.

Para Rossi, (2005), a homeopatia é capaz de combater viroses e doenças causadas por fungos e bactérias, além de controlar pragas e incrementar a biomassa da planta, agindo na produção de metabolitos secundários, que podem aperfeiçoar a resistência da planta a determinados ataques externos.

Andrade e Casali (2011) ressaltam que a homeopatia na agricultura pode contribuir para uma produção de alimentos seguros e aumento da saúde no campo, visando a reduzir a utilização de agrotóxicos e outros tipos de insumos químicos.

Estudos já indicam que remédios homeopáticos possuem potencial para controle de algumas doenças do maracujazeiro. Zibetti et al. (2009), em estudo com dinamizações homeopáticas de *Cuprum metallicum*, *Ferrum metallicum*, *Propolis* e *Sulphur*, concluíram que, em ensaio com mudas de maracujazeiro, as dinamizações homeopáticas podem ser alternativa no controle da bacteriose, talvez com efeito tônico na produtividade.

Toledo et al. (2009), em trabalho com controle da pinta preta do tomateiro com preparados homeopáticos de própolis nas dinamizações 6CH, 12CH, 30CH e 60CH, concluíram que este também é um medicamento em potencial para controle desta doença.

Em trabalho desenvolvido por Nunes (2013) com o medicamento *C. carbonica* na dinamização 6CH em plantas de coentro cultivar “Verdão”, ficou constatado que este medicamento nesta dinamização não incrementou o desenvolvimento da cultura e ainda causou clorose, murcha, redução do crescimento da parte aérea e das raízes.

Os efeitos da homeopatia sobre os vegetais vão além do controle de pragas e doenças, causando atuações positivas, de acordo com a dinamização das soluções, nas variáveis produtivas da cultura (CASTRO, 2002). De acordo com as evidências e experimentos realizados com medicamentos homeopáticos, sabe-se que possuem efeitos sobre diversas culturas, destacando-se a *C. carbonica* e *Silicea terra* (OLIVEIRA, 2012).

Para Oliveira (2012), os medicamentos homeopáticos de *C. carbonica* e *S. terra* apresentaram efeitos fitotônicos em plantas de feijão após uma única aplicação, sendo os valores de altura, área foliar, massas fresca e seca incrementados pelos tratamentos. Neste mesmo trabalho, Oliveira concluiu que o feijoeiro respondeu diferentemente aos tratamentos, onde a aplicação de *C. carbonica* resultou em melhores resultados de incremento das variáveis de produção vegetal em feijoeiro.

Ao realizar aplicações de medicamentos homeopáticos em videira, Bonato et al. (2005) constataram que as dinamizações de *S. terra* 30 CH e Isoterápicos 6 CH, 12 CH e 30 CH apresentaram redução na severidade da ferrugem (*Phakopsora euviates*) em 7, 17, 9 e 18%, quando comparadas ao controle.

2.5. Indução de resistência

Devido à evolução e seleção natural, as plantas, para se protegerem de ameaças externas, passaram a produzir mecanismos de defesa. Porém, para Barros et al. (2010), existe também aqueles mecanismos de defesa já existentes, mesmo antes da chegada do patógeno.

Ainda há outros mecanismos que parecem estar inativos e que quando ativados ou induzidos podem ser ainda mais eficientes do que os já existentes. Para Silva (2007), este tipo de resistência é induzido e a planta desencadeia diversas respostas celulares que buscam bloquear o desenvolvimento do patógeno. Exemplos de respostas a ataques de patógenos que podem acontecer são as explosões oxidativas, produção de fitoalexinas, acúmulo de proteínas, e aumento na atividade de várias enzimas (FAULIN, 2010).

Estes mecanismos abortarão o processo de infecção e colonização do patógeno, por meio de reconhecimento, ativação de mensageiros secundários e expressão de genes específicos. (BARROS et al., 2010).

Dentre estes mecanismos, talvez o mais presente seja a síntese de enzimas que se acumulam em resposta a infecção e como resposta a indução de resistência. A presença de proteínas ativas ou não no tecido da planta pode apresentar grandes alterações, mostrando assim a importância de se estudar algumas enzimas principais na indução de resistência como catalase, peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (VIECELLI, 2009)

2.5.1. Catalase

A catalase (EC 1.11.1.6) está diretamente ligada à indução de resistência, sendo ativada quando há o primeiro contato do patógeno com a planta e também é responsável pela

desintoxicação das plantas em situação de estresse, degradando o H_2O_2 , (NASCIMENTO, et al., 2014). Essa enzima está relacionada a reação de hipersensibilidade presentes nas plantas após o contato com o patógeno, havendo assim, diminuição da atividade das enzimas antioxidantes gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), durante o processo de infecção (OLIVEIRA, 2012).

Quando a planta sofre por estresse biótico ocorre um aumento da atividade da peroxidase, ao contrário ocorre redução da atividade da catalase e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, causando morte celular programada na planta, o que limita a proliferação do patógeno no tecido (BERGER et al., 2011).

Margis-Pinheiro et al. (1999) relatam que, em tecidos infectados, uma redução da atividade da catalase levaria a um aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que poderia provocar a morte celular, ou seja, esta enzima é a principal via de degradação do H_2O_2 , e portanto a inibição da atividade da catalase resulta na ativação da resistência sistêmica adquirida.

2.5.2. Peroxidase

A peroxidase (EC 1.11.1.7) está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e entre outras (CAMPOS et al. 2004). Esta enzima participa efetivamente no processo de defesa das plantas, aumentando sua atividade na presença de patógenos, reduzindo assim a severidade da doença (KUHN, 2007).

Em plantas a peroxidase catalisa a oxidação e a eventual polimerização do álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio originando lignina e outros componentes da parede celular, aumentando assim a barreira física, dificultando a penetração de patógenos (OLIVEIRA, 2012).

2.5.3. Polifenoloxidase

A enzima polifenoloxidase (EC 1.10.3.2) causa degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local do rompimento celular, quando atacado por patógenos. Pode ocasionar aparecimento de substâncias escuras próximas ao local de infecção, entretanto, ainda há muito a ser estudado sobre estas reações. A polifenoloxidase geralmente tem seus níveis elevados em tecidos infectados, além de possuir importância no desenvolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência. (BARROS et al., 2010).

2.5.4. Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (E.C. 4.3.1.5) é fundamental na biossíntese de fenilpropanóides e participa da síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonóides (ALMEIDA et al., 2012).

A fenilalanina amônia-liase é a enzima do metabolismo secundário mais estudada em plantas, devido à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Enzima presente na transformação do ácido *trans*-cinâmico e da amônia, onde o ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos os quais estão presentes na formação flavonóides e ligninas, por exemplo (STANGARLIN et al., 2010).

2.6. Fitoalexinas

Em resposta a ataque de fitopatógenos, a planta produz metabólitos secundários, antimicrobianos e de baixa massa molecular que são chamados de fitoalexinas. Estas têm função de impedir ou reduzir a atividade de agentes causadores de doença, porém a taxa de produção/acúmulo depende do hospedeiro ou do patógeno (STANGARLIN, 2011).

O acúmulo destes compostos se deve a respostas da planta a diversos fatores bióticos como microrganismos e abióticos como o ácido-salicílico e a presença das fitoalexinas demonstram que as mesmas podem estar diretamente ligadas à indução de resistência nestas plantas a patógenos (Bonaldo et al., 2003).

Foram relatadas diversas fitoalexinas e entre elas a gliceolina na soja é relatada como importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (BRAGA e DIETRICH, 1987). Nicholson et al. (1987) relataram que, em sorgo, já foram identificadas quatro fitoalexinas (flavonoides 3-deoxiantocianidinas): luteolinidina, 5-metoxiluteolinidina, apigeninidina, e éster do ácido cafeico de arabinizol 5-O-apigeninidina.

Entre as fitoalexinas, destacam-se a gliceolina, presente na soja; a deoxiantocianidina, em sorgo (Bonaldo et al., 2003); e a faseolina, em feijão, que, de modo geral, são tóxicas para as células das plantas, bem como para os microrganismos (OLIVEIRA, 2012). Possuem também ação de granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Assim, mesocótilos estiolados de sorgo, cotilédones de soja (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000), bem como hipocótilos de feijão (OLIVEIRA, 2012)

mostram-se excelentes ferramentas para estudos envolvendo a ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista brasileira de Agroecologia**, 1:49-56, 2011.
- ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.d'ÁVILA. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos de maracujazeiro no Cerrado do Brasil Central**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 16p.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C de C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Review Article**, 2010. p. 231-239.
- BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 2011. p. 195-215.
- BONATO, C.M. **Homeopatia Simples: Alternativa para a agricultura familiar**. Marechal Cândido Rondon. Gráfica Escala, 2014. 50p.
- BRAGA, M.R.; DIETRICH, S.M.C. Defesas químicas de plantas: Fitoalexinas. **Acta botânica Brasileira**, 1:3-16, 1987.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P da.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 1:637-643, 2004.
- CAPORAL, F.R.; COSTABEBER J.A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios**. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 2004. 24p.
- CARVALHO, S.L.C.; STENZEL, N.M.C.; AULER, P.A.M. **Maracujá-amarelo: recomendações técnicas para cultivo no Paraná**. Londrina: IAPAR, 2015. 58p. (Boletim Técnico. n 83)
- CASTRO, D.M. **Preparações homeopáticas sobre o crescimento de cenoura, beterraba, capim limão e chambá**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2002. 51f. Tese. (Doctor Scientiae em Fitotecnia).

DI PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A. Transmissão do Passion Fruit Woodiness Vírus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização do maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, 35:139-140, 2006.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, 3:351-359, 1999.

FAULIN, M.S.A.R. **Indução de Resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*: parâmetros bioquímicos e da produção**. Piracicaba: ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2010. 146f. Tese (Doutorado em Fitopatologia).

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, 196:143-151, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA - IBGE. **Censu 2010**. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2KCN>> Acesso em: 16, novembro, 2015.

JADÃO, A.S.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do *Lettuce mosaicvirus* e *Lettuce mottle virus*. **Fitopatologia Brasileira**, 29:11-15, 2004.

JUNIOR, F.L.C.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. Belo Horizonte. **Informe Agropecuário**, 21:5-9, 2000.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. 706p.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba: ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007. 138f. Tese (Doutorado em Agronomia).

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, 25:244-249, 1999.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33: 83-91, 2011

NARITA, N. **Epidemiologia do *Cowpea aphid borne mosaic vírus* (CABMV) em maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2007. 65f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agronômicas.

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética do *Potyvirus* causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 29:378-383, jul/ago 2004.

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A.F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer**, 1:234, 2014.

NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMES, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy Science**, 84:5520-5524, 1987.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao “*passion fruit woodiness virus*”. **Fitopatologia Brasileira**, 24:76-79, 1999.

NUNES, F.J. Observação da influência de *Calcareo carbonica* na dinamização 6CH sobre o crescimento e desenvolvimento do coentro (*Coriandrum sativum* L.) cultivar “Verdão”. Resumos do VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA. **Resumos...** Porto Alegre: Cadernos de Agroecologia, 2013.

OLIVEIRA, J.S.B. **Medicamentos homeopáticos, crescimento *in vitro* de *Pseudocercospora griseola* e fisiologia e bioquímica do feijoeiro**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. 151f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

OLIVEIRA, J.S.B.; MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BBONATO, C.M. CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PICOLI, M.H.S. Activation of biochemical defense mechanisms in

bean plants for homeopathic preparations. **African Journal of Agricultural Research**, 9:971-981, 2014.

RABELO, L.C. **Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic vírus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot vírus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002. 67f. Dissertação (mestrado em Agronomia).

RESENDE, A.V.; SANZONIWICZ, C.; SENA, M.C.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G. **Manejo de solo, Nutrição e adubação do maracujazeiro-azedo na Região do Cerrado**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008. 34p.

RISSATO, B.B.; STANGARLIN, J.R.; COLTRO-RONCATO, S.; DILDEY, O.D.F.; GONÇALVES, E.D.V.; LORENZETTI, E. Homeopatia como método alternativo no controle de doenças em plantas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, **Journal of Agronomic Sciences**, 1:92-105, 2016.

ROSSI, F. **Aplicação de preparados homeopáticos em morango e alface visando o cultivo com base agroecológica**. Piracicaba: Escola Superior em Agronomia “Luiz de Queiroz”, 2005. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, 30:129-137. 2000.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO - SEAB, DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL - DERAL. **Fruticultura: maio de 2015**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf> Acesso em: 04 de dezembro de 2016.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007. 110f. Tese (Doutorado em Fitopatologia).

SOUZA, A.F.; COLLET, M.A.; BONATO, C.M. Efeito de soluções homeopáticas no controle da ferrugem (*Phakopsora euvitis* Ono) em videira. **Apadec**, 9:27-30, 2005.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCWHAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O.J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivo do Instituto Biológico**, 7:91-98, 2010.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, 10:18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. California: Artmed, 2013. 643p.

TICHAVSKY, R. **Manual de Agrohomenopatia**. México: Instituto Comenius y Secretaria de Desarrollo Social, 2007. 40p.

TOLEDO, M.V.; STANGARLIN, J.R.; BONATO, C.M. Controle da Pinta Preta em Tomateiro com Preparados Homeopáticos de Própolis. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE HOMEOPATIA, II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AGROECOLOGIA. Curitiba, 2009. **Resumos...** Curitiba: Agroecologia, 2009. p. 325-329.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M.; LEBEDA, P.P.A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 68:22-32, 2006.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 34:68-71, 2006.

VASCONCELLOS, M.A.S.; FILHO, J.D. Ecofisiologia do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, 21:25-28, 2000.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, 34:87-96, 2009.

ZERBINI Jr. F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Doenças causadas por vírus em maracujazeiro. In: ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA, Viçosa, 1999. **Resumos...** Viçosa: UFV, 1999. p. 135-145.

ZIBETTI, A.P.; MOREIRA, F.C.; FILHO, B.A.A.; BONATO, C.M. Efeito de Medicamentos Homeopáticos em Maracujazeiro (*Passiflorae* sp) infectado por *Xanthomonas campestris* pv.

Passiflorae. In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTIFICA, CESUMAR, Maringá. **Resumos...** Maringá: CESUMAR, 2009.

CAPITULO 1

Atividade enzimática e prevenção de *Cowpea aphid-born mosaic virus*, em mudas de maracujazeiro amarelo cultivar 275, tratadas com *Calcareia carbonica*.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar se os medicamentos homeopáticos de *Calcareia carbonica* podem reduzir a severidade do vírus CABMV em mudas de maracujazeiro. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, no campus de Maringá-PR, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela foi constituída por três vasos, cada um com uma planta. O medicamento homeopático utilizado como tratamento neste experimento foi *C. carbonica*, nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. Os parâmetros avaliados foram o índice de crescimento diário das plantas, teor de clorofila a, b e total, severidade da doença e análise enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e fitoalexinas relacionadas à patogênese. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os efeitos significativos do teste F foram comparados pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, visando à comparação das médias entre os tratamentos. Os tratamentos com dinamizações de *C. carbonica* não diferiram entre si, ao avaliar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) do CABMV e não reduziram o índice de crescimento de planta. Os medicamentos homeopáticos de *C. carbônica* em 12CH e 24CH promoveram redução da quantidade de clorofila a (25% para ambas dinamizações), onde também houve a redução da clorofila total ao aplicar as dinamizações 12CH e 24CH. *C. carbonica* reduziu a atividade específica da catalase e peroxidase comparado à testemunha. A polifenoloxidase não foi influenciada pela aplicação dos tratamentos, enquanto a fenilalanina amônia-liase foi reduzida nas dinamizações de 12CH e 60CH comparado à testemunha. Para as fitoalexinas, deoxiantocianidina e faseolina, a *C. carbonica* não causou nenhum efeito na indução. Para a gliceolina, houve indução de produção, na dinamização calculada de 35,5CH.

Palavras-chave: Patógenos, homeopatia, enzimas, CABMV.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify if *Calcareo carbonica* homeopathic dynamizations (or ultra diluted solutions) can reduce the severity of CABMV virus in passion fruit seedlings. The experiment was conducted in the greenhouse of the Department of Agronomy of the State University of Maringá - UEM, in the campus of Maringá-PR in a completely randomized design (DIC), with 5 treatments and 5 replicates. Each plot consisted of three pots, each with one plant. The homeopathic drug used as treatment in this experiment was C. carbonic, in the dynamics 12CH, 24CH, 30CH and 60CH. The parameters evaluated were daily growth index of plants, chlorophyll A, B and Total content, disease severity and enzymatic analysis of peroxidase, catalase, polyphenoloxidase, phenylalanineammonia-lyase and phytoalexins related to pathogenesis. The results were submitted to analysis of variance and the significant effects of the F test were compared by the Duncan test, with a probability of 5%, aiming to compare the means between the treatments. *C. carbonica* dynamization treatments did not differ among them, when evaluating the Area Below the Disease Progression Curve (AACPD) of the CABMV and did not reduce the plant growth index. The homeopathic remedies of C. carbonic in 12CH and 24CH promoted a reduction in the amount of chlorophyll a (25% for both dynamizations), where there was also the reduction of total chlorophyll by applying the 12CH and 24CH dynamizations. *C. carbonica* reduced the specific activity of catalase and peroxidase compared to control. Already, polyphenoloxidase was not influenced by the application of the treatments, while phenylalanine ammonia-lyase was reduced in the dynamics of 12CH and 60CH compared to control. For phytoalexins, deoxythyanocyanidine and phaseolin the *C. carbonica* had no effect on induction. For the glycerol, there was an induction in the production in the calculated stimulation of 35.5CH.

keywords: Pathogens, homeopathy, enzymes, CABMV.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Departamento de Economia Rural (DERAL, 2016) da Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SEAB), no ano de 2015, a produção agrícola bruta do Paraná foi de 77,82 bilhões de reais e a fruticultura foi responsável por 2 a 3% deste valor. Este percentual é considerado pequeno quando comparado ao valor bruto total, mas, por ser uma atividade praticada por pequenos agricultores, representa uma expressividade muito grande, principalmente para municípios exclusivamente agrícolas.

Entre as 35 espécies de frutas cultivadas no Paraná (SEAB, 2015), o maracujá vem se destacando por possuir longo período de safra e representar retorno econômico aos agricultores (MELETTI, 2011). Entretanto, a produção e a economia de diversos municípios vêm sendo afetada em função de uma doença que ocorre na cultura, a virose causada por isolados do vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV (NASCIMENTO et al., 2004). As plantas afetadas pelo vírus podem apresentar sintomas de mosaico no limbo foliar, deformação de folhas, enrugamento, espessamento do pericarpo e o endurecimento do fruto, problemas que afetam diretamente a comercialização (NARITA 2007). Esta doença não possui controle convencional, restando apenas manejo para evitar sua entrada nos pomares. Assim, necessita-se de pesquisas relacionadas ao seu controle para que o plantio volte a ser como anteriormente, possibilitando aos agricultores familiares a obtenção de renda.

Como tentativa de prevenir a virose que tem prejudicado a cultura do maracujá, foi testado o medicamento *Calcarea carbonica*, em diferentes dinamizações. Este medicamento é derivado do cálcio, um nutriente de extrema importância para as plantas, pois é constituinte e responsável pela estruturação das paredes celulares, conferindo assim resistência física, mecânica e também a doenças e pragas (TAIZ e ZEIGER, 2013). Resende et al. (2008) afirmam que sua deficiência pode causar morte da gema apical, pontuações necróticas nos bordos foliares, amarelecimento e folhas desuniformes. As gavinhas do terço médio podem ficar enegrecidas e ocorrer internódios mais curtos, além de tornar os frutos verde-pálidos e com a casca espessa.

Tichavsky (2007) explica que a *C. carbonica* é um policrestos amplamente utilizado na agrohomeopatia. Com muitas funções no sistema de uma planta, ela pode contribuir para a rigidez do tronco e das folhas, dar consistência à epiderme das plantas e frutos, além de proporcionar a proteção da epiderme.

Na homeopatia, Hahnemann extraiu o carbonato de cálcio da concha de ostra, pois imaginava que ali estaria na forma mais pura este mineral. Entretanto, posteriormente, descobriu que também estavam presentes outros compostos, como fosfato de cálcio (OLIVEIRA, 2012).

Devido às dificuldades no manejo e controle da doença, o objetivo deste trabalho foi verificar, em experimento desenvolvido em casa de vegetação, o efeito de medicamentos homeopáticos de *C. carbônica* no controle do vírus CABMV em plântulas de maracujazeiro e na ativação de mecanismo de defesa.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condução do experimento

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, no campus de Maringá-PR, em esquema de parcela subdivida 1 x 4, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições. Os tratamentos representam o medicamento *C. carbonica* nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. Cada parcela foi constituída por três vasos com uma planta em cada vaso.

As mudas de maracujá da variedade IAC 275 foram adquiridas no viveiro Rymsza Reflorest, no município de Cândido de Abreu, e foram replantadas em vasos de polietileno nº 15, com substrato consistindo de mistura de terra, areia e adubo orgânico comercial (1:1:1/2; p:p:p).

As soluções de *C. carbonica* foram utilizadas nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH (centesimal hahnemanniana = CH) e como testemunha a solução hidroalcoólica a 1% (1mL de álcool 70% em 1000 mL de água destilada). As matrizes foram adquiridas na farmácia homeopática, especializada na dinamização 3CH, e deste produto as dinamizações subsequentes necessárias foram feitas no laboratório de Homeopatia e Fisiologia Vegetal da Universidade de Maringá, de acordo com normas descritas no Manual de Normas Técnicas para a Farmácia Homeopática (ZIBETTI et al., 2009).

Para a aplicação dos tratamentos, utilizou-se borrifadores manuais, com capacidade para 500 ml, lavados com água e detergente neutro, após cada aplicação, para que não houvesse interferência de outros medicamentos. Os medicamentos foram utilizados na concentração de 1 mL L⁻¹ de água (BONATO, 2014) e a aplicação foi feita em toda a parte aérea da planta, até o ponto de escoamento superficial, utilizando volume de calda inicial de 15mL planta⁻¹.

As aplicações foram realizadas semanalmente a partir do dia do transplante, totalizando 6 aplicações. Após 24 horas da última aplicação, foram realizadas coletas de folhas, no terço médio da planta, para a realização das análises enzimáticas de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase bem como o teor de clorofila *a*, *b*, e total. Neste mesmo dia, realizou-se a inoculação do CABMV.

As folhas utilizadas como fonte de inóculo foram retiradas de plantas sintomáticas de CABMV. A virose nestas plantas foi confirmada pelo Dr. Valdir Yuki, pesquisador do IAC através do teste de Elisa, antes da incubação e após o aparecimento da doença.

Para obter o inoculo do vírus, realizou-se maceração de folhas de plantas sintomáticas de maracujazeiro em um almofariz de porcelana, na presença de tampão fosfato de potássio 0,02M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1g de folha para 5 mL de solução (RABELO, 2002). A inoculação foi feita em todas as plantas, na folha situada no terço médio, previamente polvilhadas com carbureto de silício (carborundum), friccionando-o com o dedo indicador umedecido na solução de inoculo. Na sequência, as folhas foram lavadas para retirar o excesso de carborundum e do inóculo.

A avaliação da severidade da doença iniciou-se aos sete dias após a inoculação, momento em que foram atribuídas notas, de acordo com a presença de sintomas na planta analisada por meio da escala adaptada de Novaes e Rezende, (1999). As notas foram de 0 a 3, sendo a nota 0 atribuída às plantas que não apresentaram nenhum sintoma do vírus; a nota 1 para plantas com sintomas de mosaico fraco, sem folhas deformadas e com bom desenvolvimento; a nota 2 para plantas com sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar; e a nota 3 às plantas com sintomas severos do mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido (Figura 1).

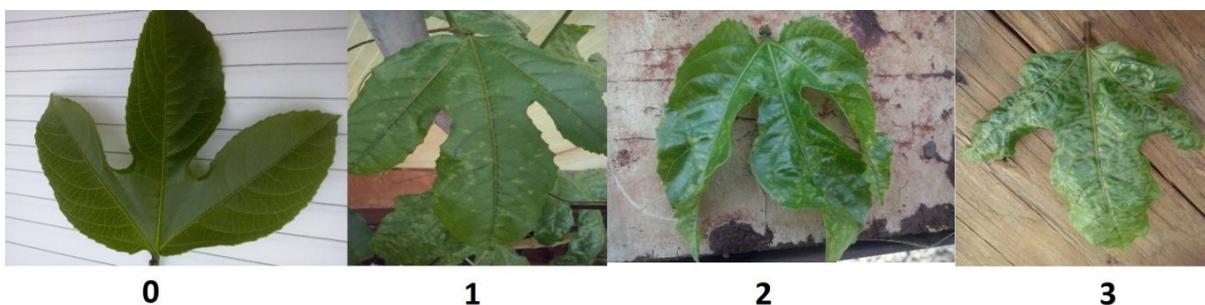


Figura 1 - Escala de notas adaptada para avaliação da presença e da severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NOVAES e REZENDE, 1999).

2.1.1. Atividade enzimática

Folhas do terço médio da planta foram coletadas após a sexta aplicação das soluções ultradiluídas e foram imediatamente acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C.

O extrato enzimático foi obtido por meio da maceração das folhas com N₂ líquido e homogeneizado mecanicamente em 4 ml de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (poli-vinilpirolidona), em almofariz. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g, durante 30 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para a determinação do conteúdo proteico

Bradford, da atividade de peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase, catalase e fenilalanina amônia liase.

Para a determinação do conteúdo proteico, cada 50 μL do sobrenadante foi adicionado, sob agitação a 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 minutos, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em mg por mL de amostra ($\text{mg proteína mL}^{-1}$), foi determinada, utilizando-se curva-padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) de 0 a 0,5 mg mL^{-1} .

A atividade da peroxidase de guaiacol (POX) foi determinada a 30°C, utilizando o método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A mistura de reação consistiu de 0,1 mL do extrato enzimático, 2,8 mL de solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi determinada por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura aos 90 segundos e a leitura aos 30 segundos será utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da polifenoloxidase (PPO), que é medida pela oxidação do catecol convertido em quinona, foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A temperatura de reação foi de 30°C e as leituras em espectrofotômetro a 420 nm, realizadas de forma direta por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura final e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada pelo método de Goth (1991), modificado por Tomankova et al. (2006), por meio do complexo estável, formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. O extrato enzimático (0,1 mL) foi incubado em 0,5 mL de mistura de reação, contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4, a 38°C, por 4 minutos. A adição de 0,5 mL de 32,4 mM de molibdato de amônio após 4 minutos de incubação foi feita para deter o consumo de peróxido de hidrogênio pela enzima presente no extrato. Foi preparado um branco para cada amostra, por meio da adição de molibdato de amônio à mistura de reação, omitindo o período de incubação. O complexo amarelo de molibdato e peróxido de hidrogênio foi medido a 405 nm. A diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H_2O_2 , foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006), sendo a mesma avaliada segundo a metodologia descrita por Kuhn (2007). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 2 horas e contendo 100 mL do extrato enzimático, 400 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A reação foi paralisada com 60 µL de HCl 5 mM. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido trans-cinâmico, e a atividade enzimática expressa em µg de ácido trans-cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.1.2. Fitoalexinas

Para a produção de fitoalexinas deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo, as sementes de sorgo foram desinfestada em hipoclorito de sódio 1% (15 minutos), lavadas em água destilada e embebidas por 6 horas, sendo em temperatura ambiente. Na sequência, as sementes foram enroladas em folhas de papel de germinação (germitest), umedecidas com água destilada. Estes rolos foram colocados em copos plásticos, contendo água destilada e incubados, no escuro, em BOD até o estiolamento da plântula.

Após o estiolamento, a alongação dos mesocótilos foi paralisada, expondo as plântulas à luz por 4 horas. Os mesocótilos foram cortados a 0,5 cm acima do nó escutelar (na base, logo acima da semente) e colocados em tubos de ensaio pequenos, contendo 1 mL do tratamento *C. carbonica* 12CH, 24CH, 30CH e 60CH (diluído em água). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente (25°C), sob luz constante, por 60 horas. Após este período, retirou-se os mesocótilos e cortou-os a 5 mm da base, descartando a base do mesocotilo. A porção superior (2,5 cm) foi cortada, pesada e colocados em microtubos (ependorf), contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl v/v). Os mesocótilos cortados permaneceram a 4°C no metanol por 96 horas para a extração dos pigmentos. A leitura da fitoalexina formada foi determinada pela absorbância a 480 nm e o cálculo realizado foi ABS g⁻¹ peso fresco.

Para a produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, sementes de soja foram semeadas em areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação sem sofrer qualquer tipo de estresse. Após a expansão total dos cotilédones, os cotilédones foram destacados, lavados em água destilada e enxutos. Na superfície inferior do cotilédone, cortou-se uma

secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro, evitando um corte muito profundo. Os cotilédones foram colocados (5 cotilédones por repetição) em caixa gerbox (desinfetada com hipoclorito 1% e álcool), contendo papel germitest umedecido com água destilada. Sobre o ferimento, imediatamente após o corte, aplicou-se 45 µL das dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. As caixas de gerbox foram mantidas a 25°C, no escuro por 20 horas. Os cotilédones foram pesados, por repetição, e transferidos para tubo tipo falcon, contendo 5 mL de água destilada, deixando por agitação na mesa agitadora por 1 hora. A absorbância foi determinada a 285 nm e o cálculo realizado foi ABS/g peso fresco.

Para a produção de fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão, as sementes de feijão foram semeadas em areia esterilizada, mantendo no escuro por aproximadamente 7 dias. O hipocótilo foi cortado logo acima da superfície do solo, até o início dos cotilédones, segmentando-o em pedaços de 5 cm. Os hipocótilos segmentados foram colocados em água destilada, enxutos e em seguida colocados em caixa gerbox (desinfestada com hipoclorito 1% e álcool) sob papel germitest umedecido com água destilada. Os tratamentos *C. carbonica* 12CH, 24CH, 30CH e 60CH foram aspergidos (2 mL) sobre os hipocótilos (5 hipocótilos por repetição) e armazenou-os a 25°C por 48 h (BOD). Após este período, os hipocótilos foram pesados e transferidos para tubos, tipo falcon, contendo 5 mL de álcool etílico e foram armazenando, por 48 horas, a 4 °C. Em seguida, os tubos foram agitados, por 1 hora, e foi realizada a leitura da absorbância. A absorbância foi determinada a 285 nm e o cálculo realizado foi ABS g⁻¹ peso fresco.

2.1.3. Determinação do teor de clorofila

Para a quantificação dos teores de clorofila, as 45 amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar contendo 10 ml de acetona 80%, durante 7 dias, no escuro, em B.O.D a 25°C. Após esse período, foi realizada leitura em espectrofotômetro, a 663nm e 645nm, para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A determinação do teor de clorofila *a* deu-se pela fórmula $(0,0127.A663)-(0,00269.A645)$ e clorofila *b* pela fórmula $(0,0229.A645)-(0,00468.A663)$ (ARNON, 1949). O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b*. Os valores foram expressos em mg g⁻¹ tecido fresco.

2.2. Parâmetros biométricos: altura de plantas e número de folhas

Para a determinação dos parâmetros biométricos, como altura de plantas e número de folhas, foram realizadas medições e contagens semanais, na mesma ocasião em que foram realizadas as aplicações dos medicamentos homeopáticos.

Para a medição da altura de plantas, utilizou-se uma régua graduada, medindo-se todas as plantas das repetições, obtendo, assim, uma média simples para cada repetição. O mesmo cálculo foi feito para o número de folhas.

2.3. Análises estatística

Os resultados obtidos das variáveis severidade da CABMV e atividade específica da catalase, peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, bem como a determinação do teor clorofila *a*, *b* e total foram submetidos ao teste de homogeneidade de dados pelo teste de Shapiro-wilk. Atendido aos pressupostos de homogeneidade dos dados, estes foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Para os parâmetros biométricos de altura e numero de folhas utilizou-se o Test-T.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos não diferiram entre si ao avaliar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de CABMV em plântulas de maracujazeiro (Figura 2).

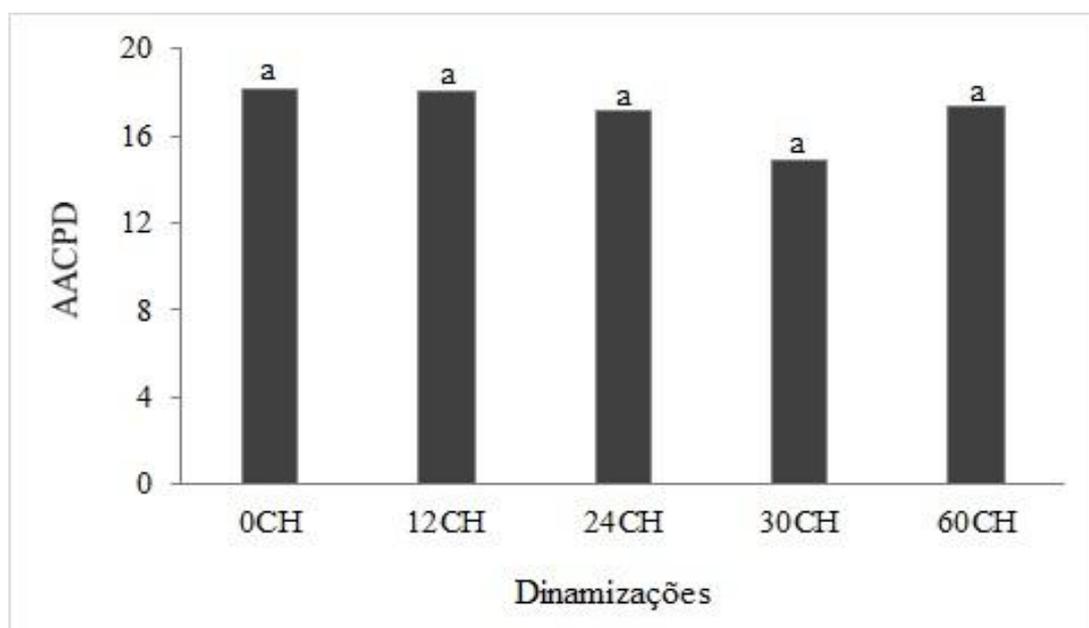


Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) causada por *Cowpea aphid-born mosaic virus* (CABMV) em função da aplicação de dinamizações de *Calcareea carbonica* em plântulas de maracujazeiro. 0CH = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Considerando as condições específicas deste trabalho, Observou-se que a *C. carbonica* não influencia na severidade do vírus CABMV. Entretanto, resultados positivos de controle de doenças foram observados por Rossi (2005), que notou reação positiva das folhas sintomáticas de mamoeiro infectado pelo vírus do mosaico após 4 dias do tratamento com *Tabacum* 30CH.

Quanto à atividade específica das enzimas (Figuras 3 e 4), a aplicação das dinamizações de *C. carbonica* reduziu a atividade específica da catalase em todos os tratamentos quando comparado à testemunha. A atividade da enzima peroxidase foi elevada ao aplicar as dinamizações 12CH e 30CH, sendo superiores ao controle em 20% e 25% respectivamente.

Esta alternância de redução na catalase e elevação na atividade da peroxidase podem ser explicadas, possivelmente, pelo fato de as enzimas estarem envolvidas com produção das espécies reativas de hidrogênio, ou seja, ambas trabalham com o mesmo substrato

(OLIVEIRA, 2012). Soares e Machado (2007) explicam que, neste processo, o radical superóxido pode passar por reações de oxirredução, transformando-se em O₂ e H₂O₂ e em seguida o H₂O₂ pode ser convertido a O₂ e H₂O pela ação da catalase, ou pode ser convertido a H₂O pela ação da peroxidase.

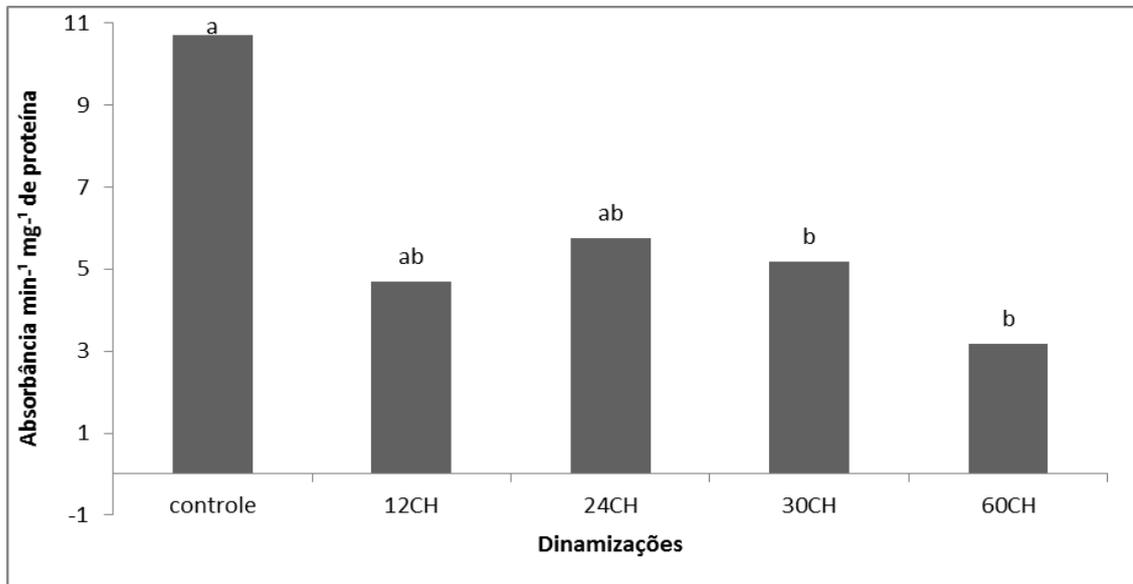


Figura 3 - Atividade específica de catalase em folhas, em função das aplicações das dinamizações de *Calcareia carbônica* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%.

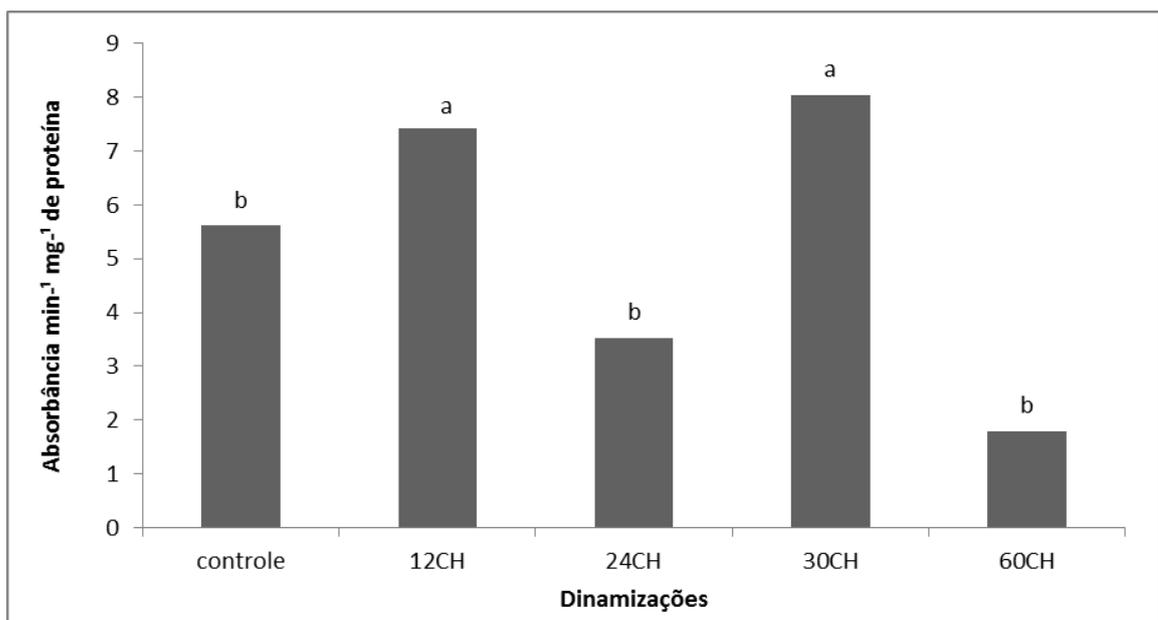


Figura 4 - Atividade específica de peroxidase do guaiacol em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Calcareia carbônica* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%.

A atividade específica da polifenoloxidase (Figura 5) não foi influenciada pela aplicação dos tratamentos, enquanto a atividade específica da fenilalanina amônia-liase (Figura 6) foi reduzida ao aplicar as dinamizações 12 CH e 60 CH, quando comparado ao controle.

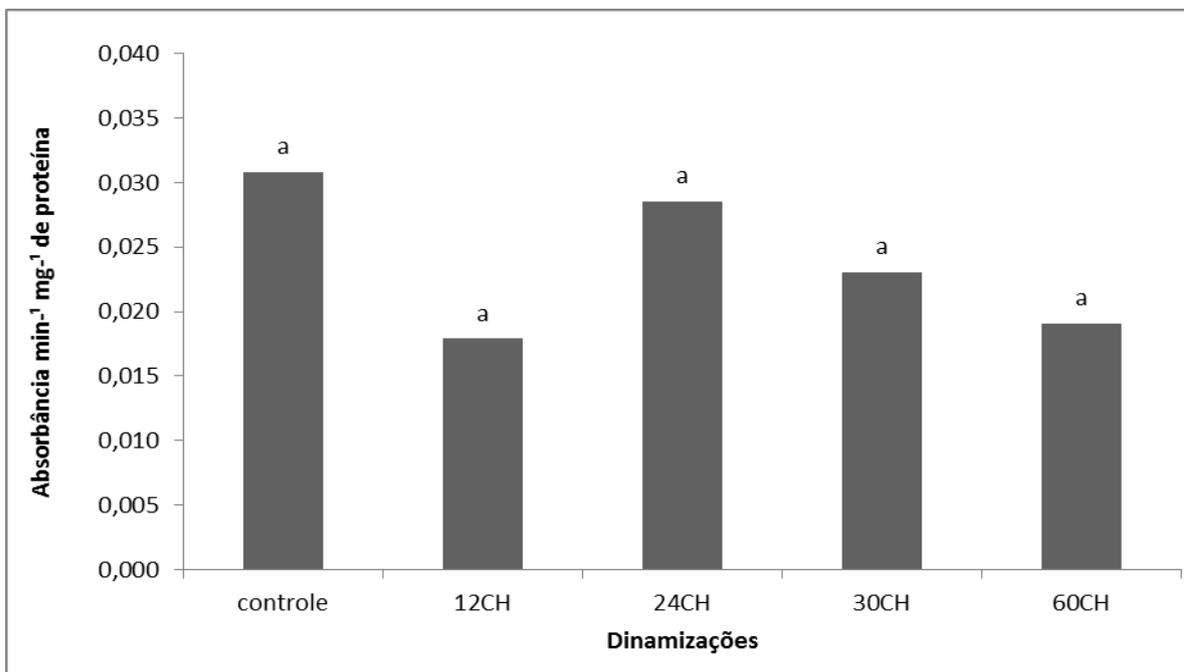


Figura 5 - Atividade específica de polifenoloxidase em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Calcareo carbônica* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%.

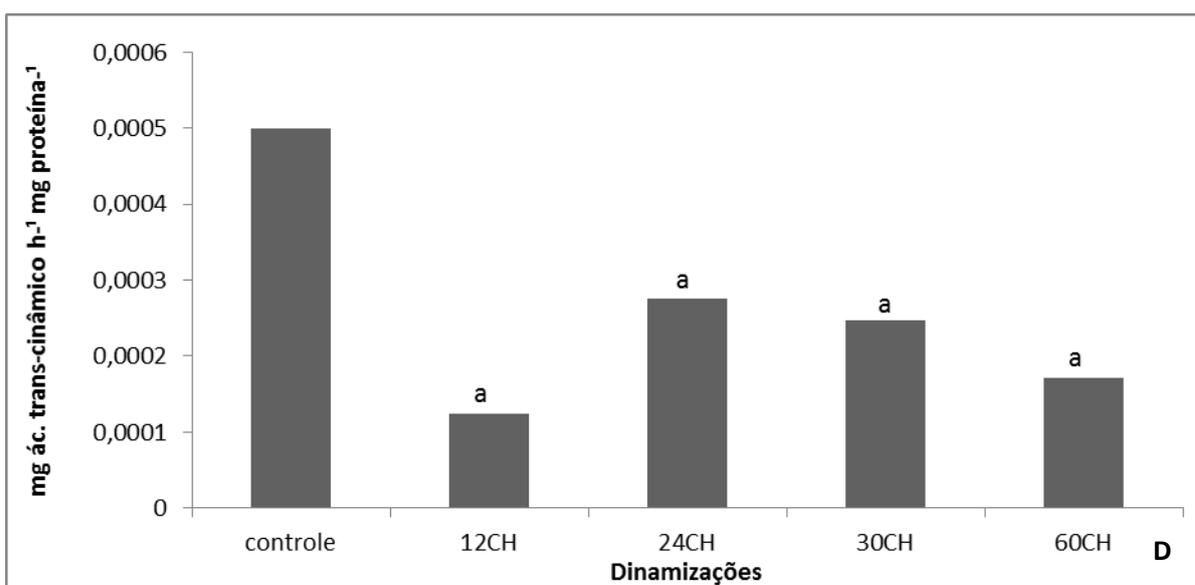


Figura 6 - Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Calcareo carbônica* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%.

A *Calcarea carbonica* promoveu acúmulo da gliceolina, com pico máximo em 35,5CH (dinamização calculada), com acúmulo de 6 vezes mais fitoalexinas que a aplicação do controle.(figura 7).

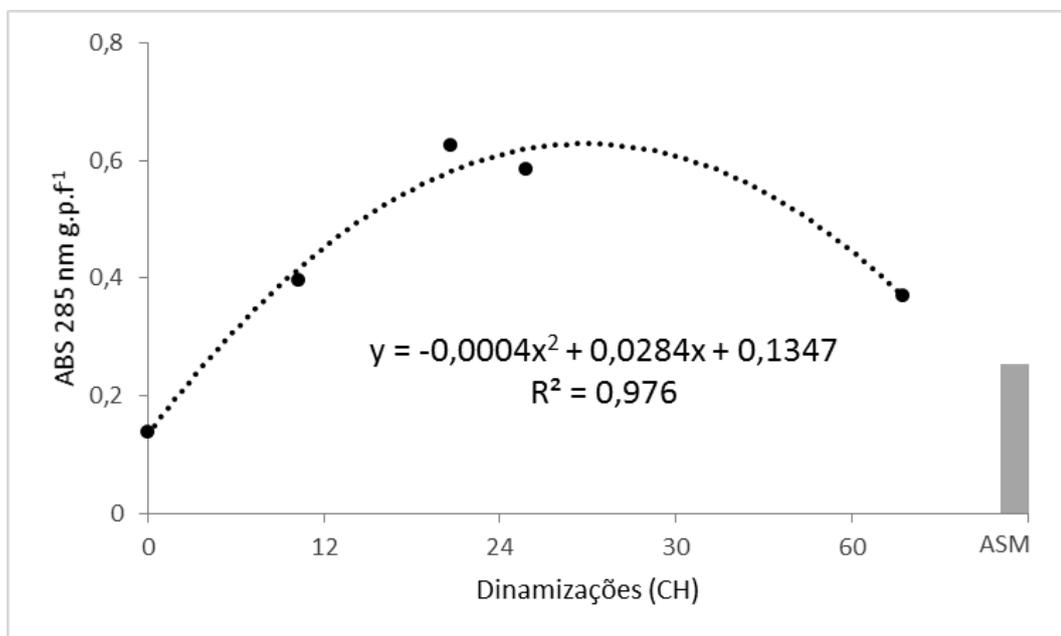


Figura 7 - Acúmulo de gliceolina em função de diferentes dinamizações de *Calcarea carbonica*. ASM= acibenzolar- S- metil.

Para os teores de clorofila (Tabela 1), pode-se verificar que as dinamizações 12CH e 24CH reduziram o teor de clorofila *a* (25% para ambas dinamizações). Em função da redução da quantidade de clorofila *a*, houve redução da clorofila total ao aplicar as dinamizações 12CH e 24CH, com redução de 23% para ambas. Este fato pode indicar que a planta direcionou a energia produzida por meio da fotossíntese para outras vias metabólicas, como, por exemplo, a produção de enzimas relacionadas à indução de resistência.

Sabe-se que a indução da resistência gera custos para a planta e este custo é definido por Heil (2002) como todo efeito negativo sobre a adaptação da planta, que resulta da expressão de características de defesa quando a planta cresce sob condições relevantes. Assim, é necessário levar em consideração os custos do processo interno, como alocação de carbono e autotoxicidade.

Gayler et al. (2004) propuseram um balanço energético na planta, onde disponibiliza-se assimilados por meio da fotossíntese e estes são utilizados para crescimento e produção de biomassa, porém, parte destes assimilados é carregada para geração de defesas constitutivas e o que não é utilizado pode ir para órgãos de reserva.

Tabela 1 - Clorofila a, b e Total em função da aplicação de dinamizações de *Calcareo carbonica* em plântulas de maracujazeiro

Tratamento	Clorofila a (mg g ⁻¹ tecido fresco)	Clorofila b (mg g ⁻¹ tecido fresco)	Clorofila Total (mg g ⁻¹ tecido fresco)
Controle	0,12 a	0,04 ^{ns}	0,17 a
Calcareo 12CH	0,09 b	0,03	0,13 b
Calcareo 24CH	0,09 b	0,03	0,13 b
Calcareo 30CH	0,10 ab	0,04	0,14 ab
Calcareo 60CH	0,10 ab	0,04	0,14 ab
CV%	13,26	19,30	14,17

Teste de médias: Duncan a 5% de probabilidade.

Oliveira et al. (2014) observaram que aplicações de *C. carbonica* em feijoeiro, nas mesmas dinamizações utilizadas neste trabalho, não influenciaram o teor de clorofila a, b e total. Os autores citam que, como as moléculas de clorofila a e b constituem os dois sistemas de pigmentos responsáveis pela absorção e transferência de energia radiante. Esta redução nos teores de clorofila sugerem um desvio na produção de energia primária para síntese dos compostos de defesa da planta.

Para os parâmetros biométricos realizou-se o test-T e observou-se que o tratamento *C. carbonica* na dinamização 24CH causou uma redução na altura das plantas, bem como no número de folhas das plantas observadas (Figura 5).

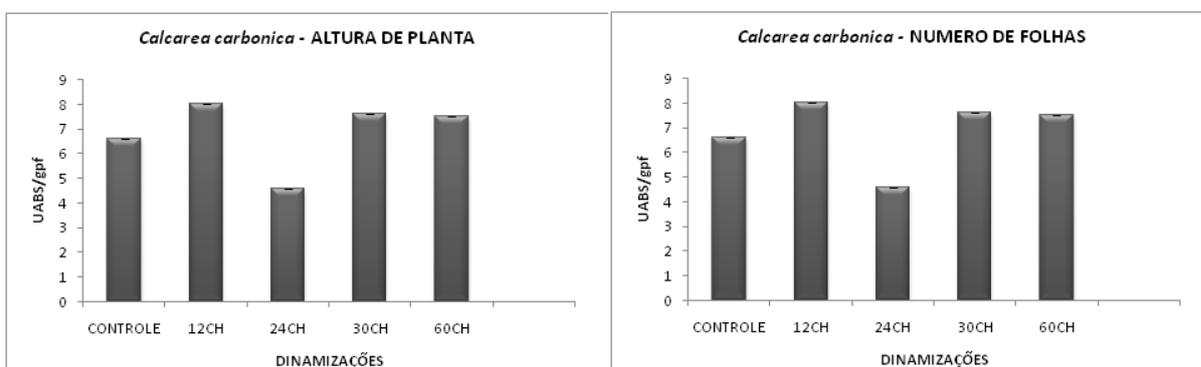


Figura 8 - Efeito de *Calcareo carbonica* em diferentes dinamizações na altura de plantas e número de folhas (NF) em plantas de maracujazeiro amarelo.

4. CONCLUSÃO

O medicamento *Calcareia carbônica*, nas condições em que o experimento foi realizado, não reduziu a severidade da virose

Houve redução da atividade específica de catalase, aumento na atividade da peroxidase e não houve influência na atividade específica da polifenoloxidase.

Em nenhuma das dinamizações utilizadas houve acúmulo de faseolina e deoxiantocianidina, mas houve acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja.

Para os parâmetros biométricos observou-se que o tratamento *C. carbonica* na dinamização 12CH causou redução na altura das plantas, bem como no número de folhas das plantas observadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.E.; PEREIRA, T.H.A.; JUNIOR, M.J.M.; TESSAROLLO, N.G.; GAMES, P.D.; BARROS, E.G.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; ABDELNOOR, R.V.; PEREIRA, P.R.G.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e susceptível à ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47:163-172, 2012.
- ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. **Revista brasileira de Agroecologia**. Viçosa: 6:49-56. 2011.
- ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.d'Á. **Incidência e distribuição do Vírus do Endurecimento dos Frutos de Maracujazeiro no Cerrado do Brasil Central**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados. 2001. 16p.
- ARNON, D.I. **Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris***. **Plant Physiology**. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437905/?page=1>> Acesso em 15 de fevereiro de 2017.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, 26:231-239, 2010.
- BONATO, C.M. **Homeopatia Simples: Alternativa para a agricultura familiar**. Marechal Cândido Rondon: Gráfica Escala, 2014. 50p.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39:637-643, 2004.
- CAPORAL, F.R.; COSTABEBER J.A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios**. MDA/SAF /DATER-IICA. Brasília: EMAT, 20R/PA 04. 24p.
- CARVALHO, S.L.C.; STENZEL, N.M.C.; AULER, P.A.M. **Maracujá-amarelo: recomendações técnicas para cultivo no Paraná**. Londrina: IAPAR, 2015. 58p. (Boletim Técnico. n 83).

CASTRO, D.M. **Preparações homeopáticas sobre o crescimento de cenoura, beterraba, capim limão e chambá.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 51f. Tese (Doctor Scientiae em Fitotecnia).

DI PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFINO, M.A.; Transmissão do Passion Fruit Woodiness Vírus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização do maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, 35:139-140, 2006.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, 64:351-359, 1999.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in Young Apple trees. Springer Berlin / Heidelberg. **Trees**, 18:363-371, 2004.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, 196:143-151, 1991.

HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. Oxford, UK. **Annals of Botany**, 89:503-512, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censu 2010.** Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2KCN>> Acesso em: 16, novembro, 2015.

JADÃO, A.S.; PAVAN, M.A.; KRAUSE-SAKATE, R.; ZERBINI, F.M. Efeitos na fotossíntese e área foliar de cultivares de alface inoculadas mecanicamente com patótipos do *Lettuce mosaicvirus* e *Lettuce mottle virus*. **Fitopatologia Brasileira**, 29:11-15, 2004.

JUNIOR, F.L.C.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. Belo Horizonte. **Informe Agropecuário**, 21:5-9, 2000.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. 706p.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e**

produção. Piracicaba: ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia).

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, 25:244-249, 1999.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33: 83-91, 2011.

NARITA, N. **Epidemiologia do Cowpea aphid borne mosaic vírus (CABMV) em maracujazeiro na região produtora da Alta Paulista, SP.** Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2007. 65f. Tese (Doutorado em Agronomia).

NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética do *Potyvirus* causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 29:378-383, 2004.

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A.F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, 1:234, 2014.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao “passion fruit woodiness virus”. **Fitopatologia Brasileira**, 24:76-79, 1999.

NUNES, F.J. Observação da influência de *Calcareo carbonica* na dinamização 6CH sobre o crescimento e desenvolvimento do coentro (*Coriandrum sativum* L.) cultivar “Verdão”. Resumos do VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA. **Resumos...** Porto Alegre: Cadernos de Agroecologia, PÁG, 2013.

OLIVEIRA, J.S.B. **Medicamentos homeopáticos, crescimento *in vitro* de *Pseudocercospora griseola* e fisiologia e bioquímica do feijoeiro.** Maringá: - Universidade Estadual de Maringá, 2012. 151 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

OLIVEIRA, J.S.B.; MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BBONATO, C.M. CARNEIRO, S.M.T.P.G.; PICOLI, M.H.S. Activation of biochemical defense mechanisms in bean plants for homeopathic preparations. **African Journal of Agricultural Research**, 9:971-981, 2014.

RABELO, L.C. **Seleção de estirpe fraca do Zucchini yellow mosaic vírus (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (Papaya ringspot vírus) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita**. Piracicaba: Escola Superior em Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

RESENDE, A.V.; SANZONIWICZ, C.; SENA, M.C.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. FALEIRO, F.G. **Manejo de solo, nutrição e adubação do maracujazeiro-azedo na Região do Cerrado**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, ago/2008. 34p.

RISSATO, B.B.; STANGARLIN, J.R.; COLTRO-RONCATO, S.; DILDEY, O.D.F.; GONÇALVES, E.D.V.; LORENZETTI, E. Homeopatia como método alternativo no controle de doenças em plantas. **Journal of Agronomic Sciences**, 5: 92-105, 2016.

ROSSI, F. **Aplicação de preparados homeopáticos em morango e alface visando o cultivo com base agroecológica**. Piracicaba: Escola Superior em Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO - SEAB, DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL - DERAL. **Fruticultura: maio de 2015**. Disponível em < http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf > Acesso em: 04, dezembro, 2016.

SOUZA, A.F.; COLLET, M.A.; BONATO, C.M. Efeito de soluções homeopáticas no controle da ferrugem (*Phakopsora euvitidis* Ono) em videira. **APADEC**, 9:27-30, 2005.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCWHAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O.J. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, 10:18-46, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. California: Artmed, 2013. 643p.

TICHAVSKY, R. **Manual de Agrohhomeopatia**. México: Inst. Comenius y Secret. Desarrollo Social, 2007. 40p.

TOLEDO, M.V.; STANGARLIN, J.R.; BONATO, C.M. Controle da Pinta Preta em Tomateiro com Preparados Homeopáticos de Própolis. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE HOMEOPATIA, II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AGROECOLOGIA. Curitiba, 2009. **Resumos...** Curitiba: AGROECOLOGIA, 2009. p. 325-329.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M.; LEBEDA, P.P.A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 68:22-32, 2006.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 34:68-71, 2006.

VASCONCELLOS, M.A.S.; FILHO, J.D. Ecofisiologia do Maracujazeiro. **EPAMIG - Informe Agropecuário**, 21:25-28, 2000.

ZERBINI Jr. F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Doenças causadas por vírus em maracujazeiro. In: ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA. Viçosa, 1999. **Resumos...** Viçosa: UFV, 1999. p. 135-145.

ZIBETTI, A.P.; MOREIRA, F.C.; FILHO, B.A.A.; BONATO, C.M. Efeito de Medicamentos Homeopáticos em Maracujazeiro (*Passiflorae* sp) infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*. In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTIFICA CESUMAR. Maringá. 2009. **Resumos...** Maringá: CESUMAR, 2009.

CAPITULO 2

Atividade enzimática e prevenção de *Cowpea aphid-born mosaic virus*, em mudas de maracujazeiro amarelo, cultivar 275, tratadas com *Silicea terra*

RESUMO

Uma forma de realizar uma produção mais saudável é através da agricultura com base agroecológica que quando em equilíbrio é capaz de induzir a resistência na planta, e assim ela se defender do ataque de patógenos, inclusive o maracujazeiro ao *Cowpea aphid born mosaic virus* – CABMV. Assim o objetivo deste trabalho foi verificar se as dinamizações homeopáticas de *Silicea terra* podem reduzir a severidade do vírus CABMV em mudas de maracujazeiro. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos e 5 repetições. Cada parcela foi constituída por três vasos, cada um com uma planta. Os medicamentos homeopáticos utilizados como tratamento neste experimento foram *S. terra*, nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. Os parâmetros avaliados foram o Índice de crescimento diário das plantas, teor de clorofila *a*, *b* e total, severidade da doença e análise enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e fitoalexinas relacionadas a patogênese. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os efeitos significativos do teste F foram comparados pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade, visando à comparação das médias entre os tratamentos. O tratamento *S. terra* 60CH foi 22% mais eficiente em reduzir a severidade da doença. O tratamento *S. terra* também não influenciou o índice de altura de planta e os teores de clorofila *a*, *b* e total. Observou-se o aumento na atividade das enzimas catalase e peroxidase ao aplicar dinamizações de 12CH do medicamento. Polifenoloxidase não foi influenciada pela aplicação dos tratamentos, enquanto a atividade específica de fenilalanina amônia-liase foi reduzida ao aplicar a dinamização 30CH. Conclui-se neste trabalho que o medicamento homeopáticos *S. terra* nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH e com esta metodologia não influenciaram na severidade do vírus CABMV em maracujazeiro amarelo e no crescimento das plantas cultivadas em ambiente protegido. Porém, nas atividades enzimáticas conclui-se que há potencial de uso das dinamizações de *S. terra*, pois houve produção e diferença significativa em todos os bioensaios.

Palavras-chave: Patógenos, homeopatia, enzimas, CABMV.

ABSTRACT

One way to achieve a healthier production is through agroecological based agriculture that when in equilibrium is able to induce resistance in the plant, and thus to defend itself against the attack of pathogens, including the passion fruit to Cowpea aphid born mosaic virus - CABMV. So the aim of this study was to determine whether homeopathic potencies (or ultra diluted solutions) of *Sil land* can reduce the severity of the virus in CABMV passion fruit seedlings. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 5 repetitions. Each plot consists of three vessels, each with a plant. Homeopathic medicines used as treatment in this experiment were *S. land* in dynamizations 12CH, 24CH, 30CH and 60CH. The parameters evaluated were the daily growth index of plants, chlorophyll content A, B and Total, disease severity and enzymatic analysis of peroxidase, catalase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase e phytoalexines related to pathogenesis. The results were submitted to variance analysis and the significant effects of the F test were compared by Duncun test at 5% probability, in order to compare the means between treatments. The treatments had no significant effect in reducing the severity of CABMV and did not reduce plant growth index. Treatment *S. earth* did not influence the levels of chlorophyll A, B and total. In *S. land* there was increased when applying dynamizations of 12CH. Polyphenol was not influenced by the application of the treatments, while the specific activity of phenylalanine ammonia-lyase was reduced by applying the dynamic 30CH. It is concluded in this study that homeopathic medicines *S. land* in dynamizations 12CH, 24CH, 30CH and 60CH and with this methodology did not influence the severity of CABMV virus in yellow passion fruit and the growth of plants grown in a greenhouse. However, the enzymatic activity is concluded that there is potential to use the potencies of *S. land* because there was a significant difference in production all bioassays.

Keywords: Pathogens, homeopathy, enzymes, mosaic.

INTRODUÇÃO

Diversas são as formas de prevenção e controle de doenças, entretanto, cada vez mais se utilizam agrotóxicos para isto contribuindo para um aumento da produção, mas ao mesmo tempo ajudando a aumentar a contaminação dos alimentos (STANGARLIN et al., 2011).

A fim de produzir alimentos mais saudáveis, muitos agricultores lançam mão de alternativas de produção capazes deste feito. Pode-se citar agroecologia como uma destas alternativas. Por meio de ações em conjunto, agroecologia e a agricultura buscam um equilíbrio do sistema, viabilizando a produção de alimentos livres de agrotóxicos e de adubos químicos (ROSSI, 2005).

Quando em equilíbrio com o ambiente, a planta é capaz de apresentar resistência a muitas doenças. Para contribuir para esta indução pode-se utilizar alguns formulados naturais que vão sensibilizar a planta e possibilitar que a mesma produza seus metabólitos responsáveis por combater o patógeno e protegê-la dos possíveis danos (SOARES E MACHADO, 2007 apud SILVA et al., 2008). Um exemplo de formulados capazes de induzir a resistência nas plantas são os medicamentos homeopáticos que podem ser preparados com extratos de plantas, minerais e insetos, por exemplo, e ainda não produz impactos no agroecossistema (ROSSI, 2005).

Neste trabalho, utilizou-se *Silicea terra* como medicamento e para realizar sua preparação utilizou-se o silício puro, retirado do cristal da rocha. De acordo com Bonato apud Oliveira (2012), a *S. terra* é um verdadeiro policresto para a agricultura, agindo em plantas que possuem crescimento lento ou com interrupções de crescimento, além de auxiliar na defesa de alguns fungos fitopatogênicos. Sua utilização na agricultura, pode muitas vezes contribuir para a produção de sementes saudáveis em culturas perenes e anuais, além de propiciar antecipação no florescimento de algumas plantas (OLIVEIRA, 2012).

Neste contexto, propôs-se um trabalho com o objetivo de testar medicamentos homeopáticos à base de *Silicea terra*, na ativação das enzimas catalase, peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, no controle do CABMV, na produção de clorofila e nos parâmetros altura de plantas e número de folhas.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condução do experimento

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, no campus de Maringá-Pr, em esquema de parcela subdivida 1 x 4 em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições. Os tratamentos representam o medicamento *C. carbonica* nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. Cada parcela foi constituída por três vasos.

As mudas de maracujá da variedade IAC 275 foram adquiridas no viveiro Rymsza Reflorest no município de Cândido de Abreu e foram replantadas em vasos de polietileno nº 15, com substrato consistindo de mistura de terra, areia e adubo orgânico comercial (1:1:1/2; p:p:p).

As soluções ultra diluídas de *C. carbonica* foram utilizadas nas dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH (centesimal hahnemanniana = CH) e como Testemunha a solução hidroalcoólica a 1% (1ml de álcool 70% em 1000 ml de água destilada). As matrizes foram adquiridas na farmácia homeopática especializada na dinamização 3CH destes produtos e as dinamizações subsequentes necessárias para o experimento foram feitas no laboratório de Homeopatia e Fisiologia Vegetal da Universidade de Maringá de acordo com normas descritas no Manual de Normas Técnicas para a Farmácia Homeopática (ZIBETTI et al., 2009).

Para a aplicação dos tratamentos utilizou-se borrifadores manuais, com capacidade para 500 ml, lavados com água e detergente neutro, após cada aplicação para que não houvesse interferência entre os medicamentos. Os medicamentos foram utilizados na concentração de 1ml L⁻¹ de água (BONATO, 2014) e a aplicação foi feita em toda a parte aérea da planta, até o ponto de escoamento superficial, utilizando volume de calda inicial de 15ml planta⁻¹.

As aplicações foram realizadas semanalmente a partir do dia do transplante, totalizando 6 aplicações. Após 24 horas da última aplicação foram realizadas coletas de folhas, no terço médio da planta, para a realização das análises enzimáticas de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase bem como o teor de clorofila *a*, *b*, e total. Neste mesmo dia realizou-se a inoculação do CABMV.

As folhas utilizadas como fonte de inoculo foram retiradas de plantas sintomáticas de CABMV, a virose nestas plantas foi confirmada pelo Dr. Valdir Yuki, pesquisador do IAC através do teste de Elisa, antes da incubação e após o aparecimento da doença.

Para obter o inoculo do vírus, realizou-se maceração de folhas de plantas sintomáticas de maracujazeiro em um almofariz de porcelana, na presença de tampão fosfato de potássio 0,02M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de 1g de folha para 5 ml de solução (RABELO, 2002). A inoculação foi feita em todas as plantas, na folha situada no terço médio, previamente polvilhadas com carbureto de silício (carborundum), friccionando-o com o dedo indicador umedecido na solução de inoculo. Na sequência, as folhas foram lavadas para retirar o excesso de carborundum e do inoculo.

A avaliação da severidade da doença iniciou-se aos sete dias após a inoculação, onde foram atribuídas notas, de acordo com a presença de sintomas na planta analisada pela escala adaptada de Novaes e Rezende, (1999). As notas foram de 0 a 3, onde a nota 0 foi atribuída às plantas que não apresentaram nenhum sintoma do vírus na planta; a nota 1 para plantas com sintomas de mosaico fraco, sem folhas deformadas e com bom desenvolvimento; a nota 2 para sintomas intermediários de mosaico e pouca deformação foliar e a nota 3 para aquelas apresentando sintomas severos do mosaico, deformações foliares intensas e desenvolvimento reduzido (Figura 1).

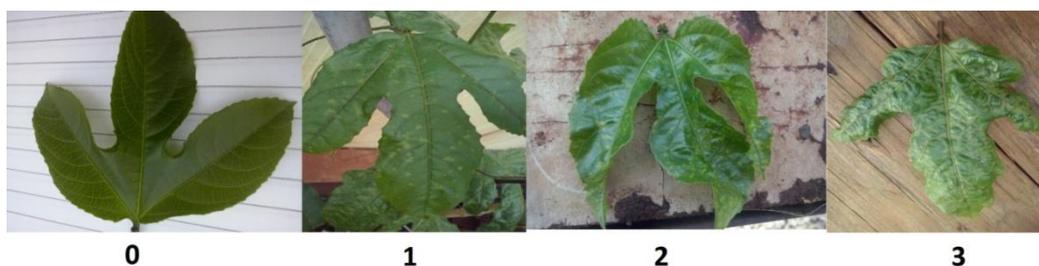


Figura 1 - Escala de notas adaptada para avaliação da presença e severidade dos sintomas do endurecimento dos frutos em maracujazeiro (NOVAES e REZENDE, 1999).

2.1.1. Atividade enzimática

Folhas do terço médio da planta foram coletas após a sexta aplicação das soluções ultra diluídas e foram imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C.

O extrato enzimático foi obtido por meio da maceração das folhas com N₂ líquido e homogeneizado mecanicamente em 4 ml de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0)

contendo 0,1 mM EDTA e 1% (p/p) de PVP (poli-vinilpirolidona), em almofariz. O homogenato foi centrifugado a 15.000 g durante 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para a determinação do conteúdo proteico Bradford, da atividade de peroxidase de guaiacol, polifenoloxidase, catalase e fenilalanina amônia liase.

Para a determinação do conteúdo proteico, cada 50 µL do sobrenadante foi adicionado, sob agitação, a 2,5 ml do reagente de Bradford. Após 5 minutos, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em mg por ml de amostra ($\text{mg proteína ml}^{-1}$), foi determinada utilizando-se curva-padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) de 0 a 0,5 mg ml^{-1} .

A atividade da peroxidase de guaiacol (POX) foi determinada a 30°C, utilizando o método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A mistura de reação consistiu de 0,1 ml do extrato enzimático e 2,8 ml de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi determinada por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura aos 90 segundos e a leitura aos 30 segundos será utilizada para a determinação da atividade. Os resultados serão expressos em absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da polifenoloxidase (PPO), que é medida pela oxidação do catecol convertido em quinona, foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A temperatura de reação foi de 30°C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 2 minutos. A diferença entre a leitura final e a leitura inicial foi utilizada para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada pelo método de Goth (1991), modificado por Tomankova et al. (2006), por meio do complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio. O extrato enzimático (0,1 ml) foi incubado em 0,5 ml de mistura de reação contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38°C por 4 minutos. A adição de 0,5 ml de 32,4 mM de molibdato de amônio após 4 min de incubação foi feita para deter o consumo de peróxido de hidrogênio pela enzima presente no extrato. Foi preparado um branco para cada amostra através da adição de molibdato de amônio a mistura de reação, omitindo o período de incubação. O complexo amarelo de molibdato e peróxido de hidrogênio foi medido a 405 nm.

A diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada indicou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H₂O₂, foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006), sendo a mesma avaliada segundo a metodologia descrita por Kuhn (2007). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 2 horas e contendo 100 ml do extrato enzimático, 400 µL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A reação foi paralisada com 60 µL de HCl 5 mM. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido trans-cinâmico, e a atividade enzimática expressa em µg de ácido trans-cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

2.1.2. Fitoalexinas

Para a produção de fitoalexinas deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo, as sementes de sorgo foram desinfestada em hipoclorito de sódio 1% (15 minutos), lavadas em água destilada e embebidas por 6 horas e mantidas em temperatura ambiente. Na sequência, as sementes foram enroladas em folhas de papel de germinação (germitest), umedecidas com água destilada. Estes rolos foram colocados em copos plásticos contendo água destilada e incubados, no escuro, em BOD até o estiolamento da plântula.

Após o estiolamento, a alongação dos mesocótilos foi paralisada, expondo as plântulas à luz por 4 horas. Os mesocótilos foram cortados a 0,5 cm acima do nó escutelar (na base, logo acima da semente) e colocados em tubos de ensaio pequenos, contendo 1 ml do tratamento *Calcareo carbonica* 12CH, 24CH, 30CH e 60CH (diluído em água). Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente (25°C) sob luz constante por 60 horas. Após este período, retirou-se os mesocótilos e cortou-os a 5 mm da base, descartando a base. A porção superior (2,5 cm) foi cortada, pesada e colocados em microtubos (ependorf) contendo 1,4 ml de metanol 80% acidificado (0,1% HCl v/v). Os mesocótilos cortados permaneceram a 4°C no metanol por 96 horas para a extração dos pigmentos. A leitura da fitoalexina formada foi determinada pela absorbância a 480 nm e o cálculo realizado foi ABS g⁻¹ peso fresco.

Para a produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, sementes de soja foram semeadas em areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação sem sofrer qualquer

tipo de estresse. Após a expansão total dos cotilédones, os cotilédones foram destacados, lavados em água destilada e enxutos. Na superfície inferior do cotilédone, cortou-se uma secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro, evitando um corte muito profundo. Os cotilédones foram colocados (5 cotilédones por repetição) em caixa gerbox (desinfetada com hipoclorito 1% e álcool) contendo papel germitest umedecido com água destilada. Sobre o ferimento, imediatamente após o corte, aplicou-se 45 μ L das dinamizações 12CH, 24CH, 30CH e 60CH. As caixas de gerbox foram mantidas a 25°C, no escuro, por 20 horas. Os cotilédones foram pesados, por repetição, e transferidos para tubo tipo Falcon, contendo 5 ml de água destilada, deixando por agitação na mesa agitadora por 1 hora. A absorbância foi determinada a 285 nm e o cálculo realizado foi ABS/g peso fresco.

Para a produção de fitoalexina faseolina em hipocótilos de feijão as sementes de feijão, foram semeadas em areia esterilizada, mantendo no escuro por aproximadamente 7 dias. O hipocótilo foi cortado logo acima da superfície do solo até o início dos cotilédones, segmentando-o em pedaços de 5 cm. Os hipocótilos segmentados foram colocados em água destilada, enxutos, e em seguida colocados em caixa gerbox (desinfetada com hipoclorito 1% e álcool) sob papel germitest umedecido com água destilada. Os tratamentos C. carbonica 12CH, 24CH, 30CH e 60CH foram aspergidos (2 ml) sobre os hipocótilos (5 hipocótilos por repetição) e armazenou-os a 25°C por 48 h (BOD). Após este período, pesou-se os hipocótilos, transferindo-os para tubos tipo Falcon, contendo 5 ml de álcool etílico, armazenando-os, por 48 horas, a 4 °C. Em seguida, os tubos foram agitados por uma hora e realizou-se a leitura da absorbância. A absorbância foi determinada a 285 nm e o cálculo realizado foi ABS g⁻¹ peso fresco.

2.1.3. Determinação do teor de clorofila

Para a quantificação dos teores de clorofila, as 45 amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar, contendo 10 ml de acetona 80%, durante 7 dias, no escuro em B.O.D a 25°C. Após esse período, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 663nm e 645nm para clorofila *a* e *b*, respectivamente. A determinação do teor de clorofila *a* deu-se pela fórmula $(0,0127.A663)-(0,00269.A645)$ e clorofila *b* pela fórmula $(0,0229.A645)-(0,00468.A663)$ (ARNON, 1949). O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b*. Os valores foram expressos em mg g⁻¹ tecido fresco.

2.2. Parâmetros biométricos: altura de plantas e número de folhas

Para determinação dos parâmetros biométricos, como altura de plantas e número de folhas, realizaram-se medições e contagens semanais, na mesma ocasião em que foram realizadas as aplicações dos medicamentos homeopáticos.

Para a medição da altura de plantas, foi utilizada uma régua graduada, medindo-se todas as plantas das repetições, obtendo-se, assim, uma média simples para cada repetição. O mesmo cálculo foi feito para o número de folhas.

2.3. Análises estatística

Os resultados obtidos das variáveis severidade da CABMV e atividade específica da Catalase, Peroxidase, Polifenoloxidase e Fenilalanina amônia-liase bem como a determinação do teor clorofila *a*, *b* e total foram submetidos ao teste de homogeneidade de dados pelo teste de Shapiro-wilk. Atendido os pressupostos de homogeneidade dos dados, estes foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Para os parâmetros biométricos de altura e número de folhas utilizou-se o Test-T.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao tratar plântulas com dinamizações de *S. terra* em maracujazeiro e avaliar a severidade do CABMV, a aplicação da dinamização 60CH reduziu em 22% a área abaixo da curva de progresso da doença quando comparado ao controle, porém os resultados não diferiram dos tratamentos 24CH e 30CH (Figura 1).

Diferentemente deste trabalho, onde o intuito era controlar a virose, alguns testes realizados com homeopatia no controle de fungos fitopatogênicos obtiveram resultados significativos. Oliveira et al. (2014), por exemplo, constataram que a aplicação de *S. terra* na cultura do feijoeiro nas dinamizações 12CH, 24CH e 30CH foram capazes de conter o crescimento micelial e esporulação do fungo *Pseudocercospora griseola in vitro*.

Outras homeopatias já foram testadas para controle de doenças, como Zibetti (2009), que, cujos estudos utilizando *Própolis* e *Cuprum metallicum* demonstraram que estes medicamentos são potenciais para o controle de *Xanthomonas campestris pv. passiflorae* em maracujazeiro amarelo.

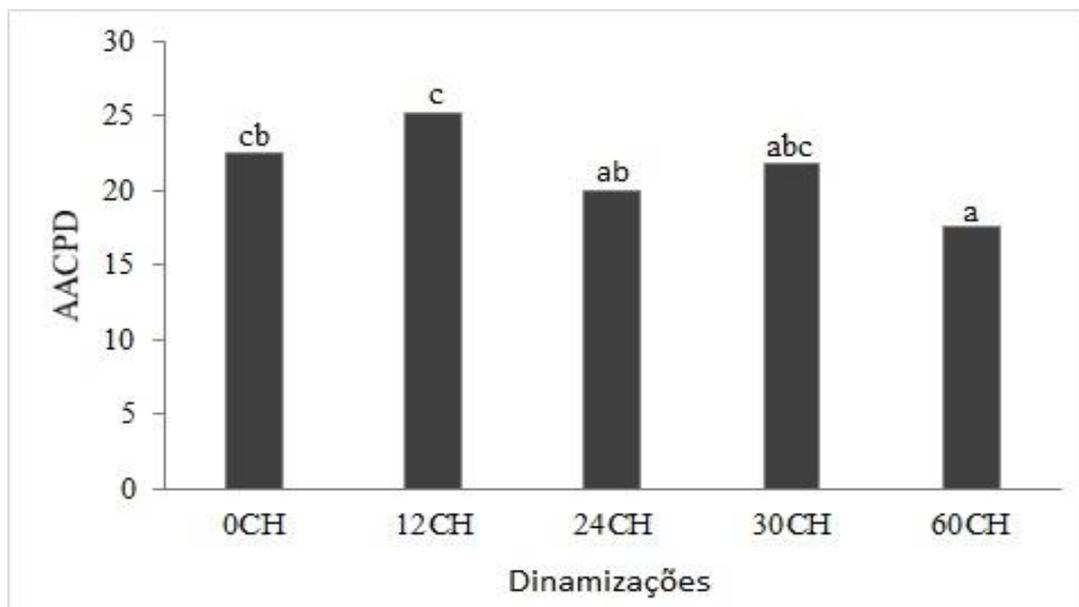


Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença causada por *Cowpea aphid-born mosaic virus* em função da aplicação de dinâmizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro. 0CH = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. CV. 14%.

Rolim et al. (2005) concluíram que bioterápicos de *Alternaria solani* nas dinâmizações 30CH e 60CH, bem como preparados *Phosphorus* 30CH e *Staphysagria* 30CH

foram capazes de reduzir a severidade da pinta preta em plantas de tomate, também para este patógeno.

Toledo et al. (2009) verificaram que medicamentos homeopáticos preparados à base de própolis nas dinamizações 6CH, 12CH, 30CH e 60CH também podem ser promissores no controle da pinta preta em tomateiro.

Em relação à enzima catalase, houve uma redução de 50% em sua atividade, comparada ao controle, quando aplicada a dinamização 60CH (Figura 3).

Para peroxidase, observou-se aumento da atividade específica em 17% ao aplicar a dinamização 12CH de *S. terra* (Figura 4). O aumento da atividade desta enzima pode ser explicada com o fato dessa enzima ser responsável pela hidroxilação de monofenóis para o-difenóis e oxidação destes em quinonas (CAMPOS et al., 2004). As quinonas presentes nos ferimentos têm ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, formando complexos com proteínas que atuam como barreira física para os patógenos (CAMPOS et al., 2004).

Diversos autores relatam que a produção da peroxidase está associada a ferimentos na planta. Neste trabalho, a operação da inoculação do vírus foi realizada de forma mecânica, com carborundum, causando assim diversos ferimentos na planta. Assim, pode-se concluir que, devido à presença destes ferimentos, a planta iniciou a produção e aumento da atividade da peroxidase, indicando aumento na biossíntese de lignina, que atua como barreira física à entrada do patógeno.

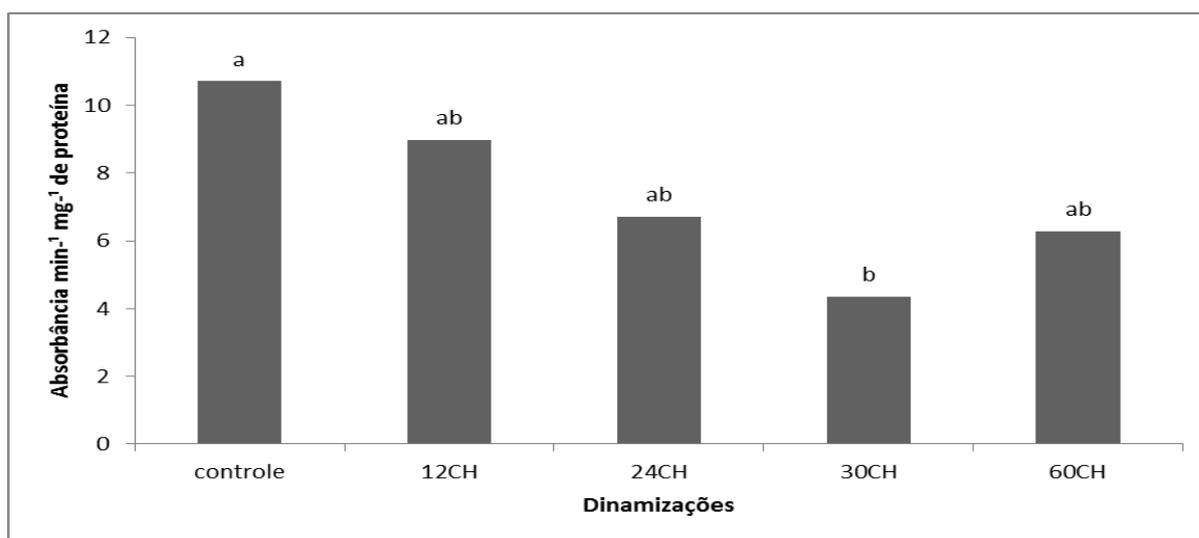


Figura 3 - Atividade específica de catalase em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. A ordem das figuras está errada. Tem que ver no trabalho

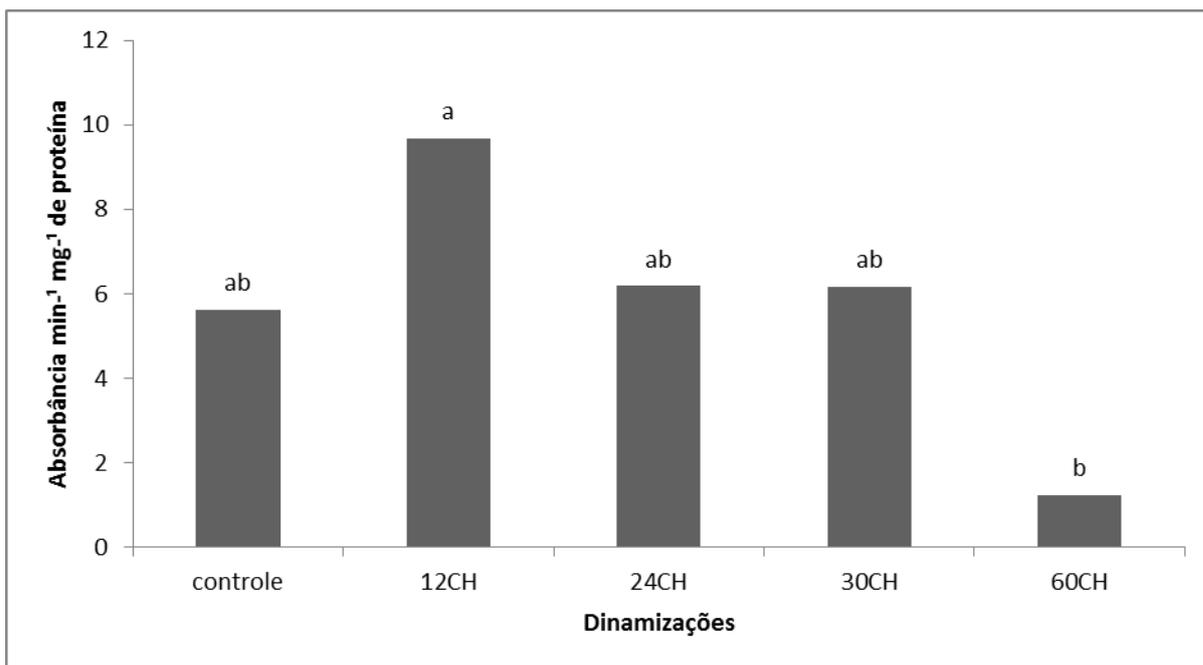


Figura 4 - Atividade específica de peroxidase do guaiacol em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

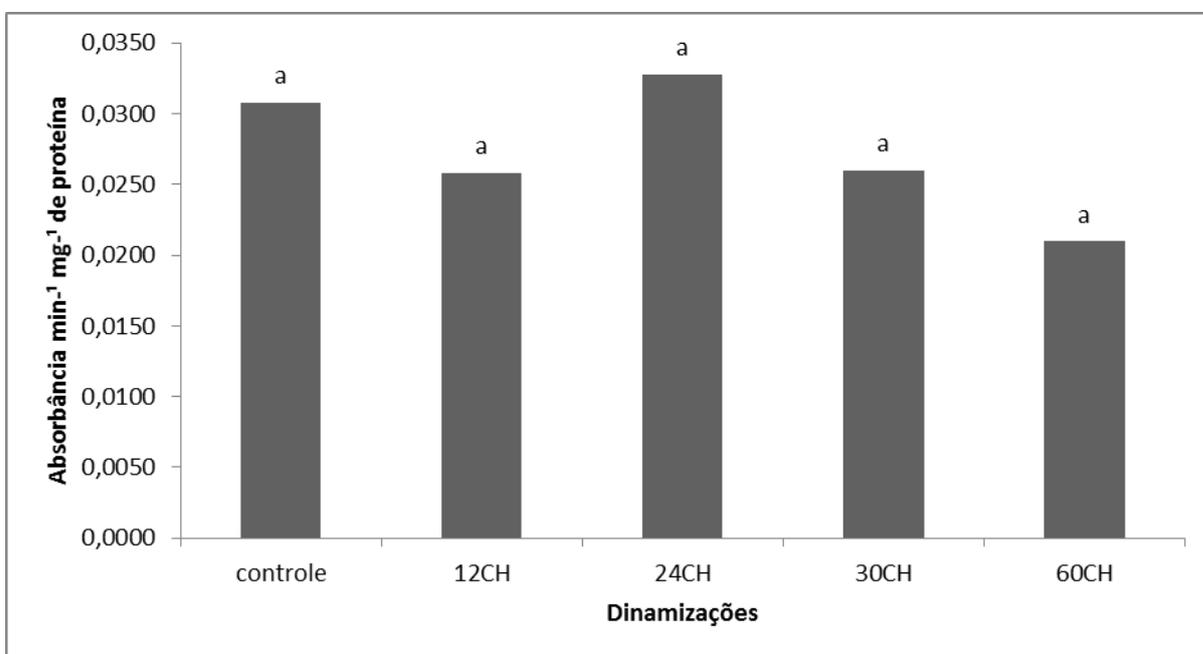


Figura 5 - Atividade específica de polifenoloxidase em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

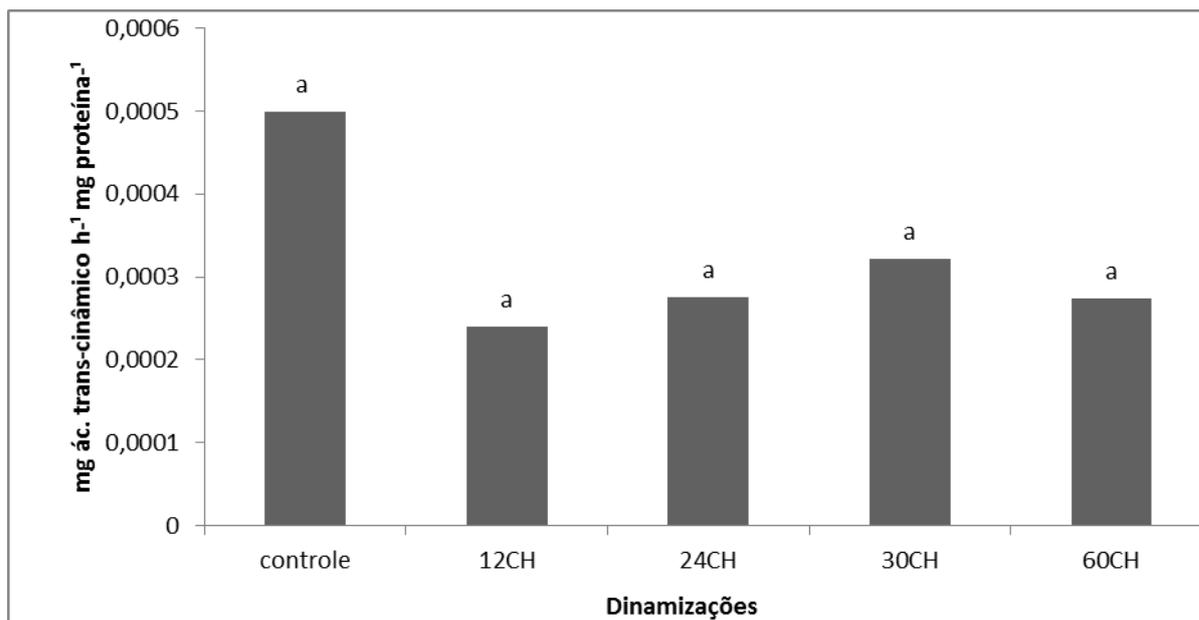


Figura 6 - Atividade específica de fenilalanina amônia-liase em folhas em função das aplicações das dinamizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro. Controle = solução hidroalcoólica a 1%. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

A atividade específica da polifenoloxidase (Figura 5) foi influenciada pela aplicação do tratamento 24CH, aumentando a atividade em 22% quando comparado à testemunha. Este aumento influenciou no aumento da resistência da doença, uma vez que esta enzima está diretamente ligada à oxidação de compostos fenólicos em quinonas, que são muito mais tóxicos à planta do que a própria polifenoloxidase, além de possuir ação protetora no local do ferimento (Campos et al., 2004). Ou seja, um aumento na produção de polifenoloxidase causa um aumento de produtos tóxicos, gerando maior grau de resistência (Agrios, 1997).

A atividade específica da fenilalanina amônia-liase (Figura 6) sofreu redução ao aplicar a dinamização 12CH, mas sem diferenciar do controle. Esta não ativação é defendida por alguns autores como consequência da presença de células sadias em torno dos ferimentos (MOZZETTI et al., 1995).

Neste trabalho, nenhum dos tratamentos interferiu na produção de faseolina em hipocótilos de feijão. Os resultados aqui obtidos divergiram dos encontrados por Oliveira et al. (2014), quando aplicaram *S. terra* 12CH em hipocótilos de feijão e observaram redução na produção da fitoalexina em 36% quando comparado a testemunha.

Para a deoxiantocianidina, o maior acúmulo calculado foi observado na dinamização de 61,79CH, com absorvância gpf^{-1} de 16,6 (Figura 7). Para a gliceolina, o maior acúmulo foi observado na dinamização de 53 CH, com absorvância gpf^{-1} de 0,473 (Figura 8). Esses

resultados indicam o efeito elicitor da *Silicea terra* como potencial para induzir a produção destas fitoalexinas e ativar mecanismos de defesas.

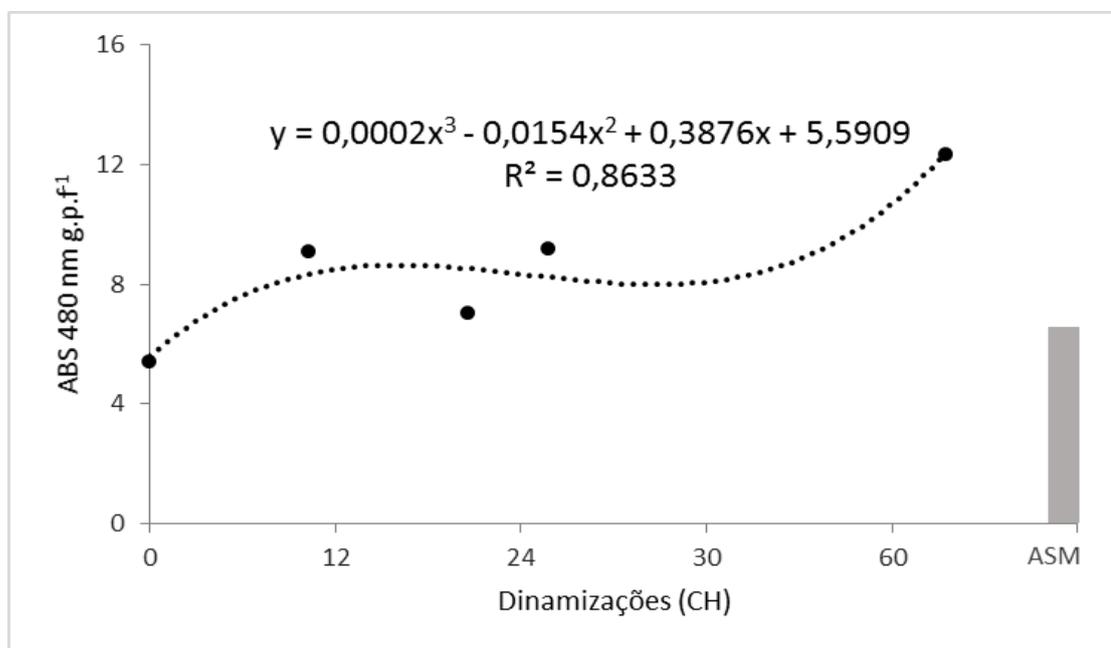


Figura 7 - Indução de deoxiantocianidina em mesocótilos de sorgo tratados com diferentes dinamizações homeopáticas de *Silicea terra*. ASM= acibenzolar-S-metil.

Ao avaliar o teor de clorofila em plântulas de maracujazeiro tratadas com dinamizações de *S. terra* não foram observadas diferenças entre os tratamentos para clorofila *a*, *b* e total (Tabela 1). Neste estudo, os teores de clorofila *a*, *b* e total não sofreram influência do tratamento com *S. terra* em nenhuma dinamização. Resultados diferentes foram encontrados por Oliveira et al. (2014), quando aplicaram *S. terra*. Esses pesquisadores verificaram redução nos teores de clorofila total, *a* e *b*. Estas reduções foram de 33% no teor de clorofila *a* em 24CH e 30CH e em 60CH a redução foi de 26%.

Tabela 1 - Teor de Clorofila *a*, *b* e Total em função da aplicação de dinamizações de *Silicea terra* em plântulas de maracujazeiro

Tratamento	Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ tecido fresco)	Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ tecido fresco)	Clorofila Total (mg g ⁻¹ tecido fresco)
Controle	0,11 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,16 ^{ns}
Silicea 12CH	0,14	0,05	0,19
Silicea 24CH	0,10	0,04	0,14
Silicea 30CH	0,11	0,04	0,16
Silicea 60CH	0,11	0,04	0,15
CV%	30,62	28,41	29,10

Teste de médias: Duncan a 5% de probabilidade.

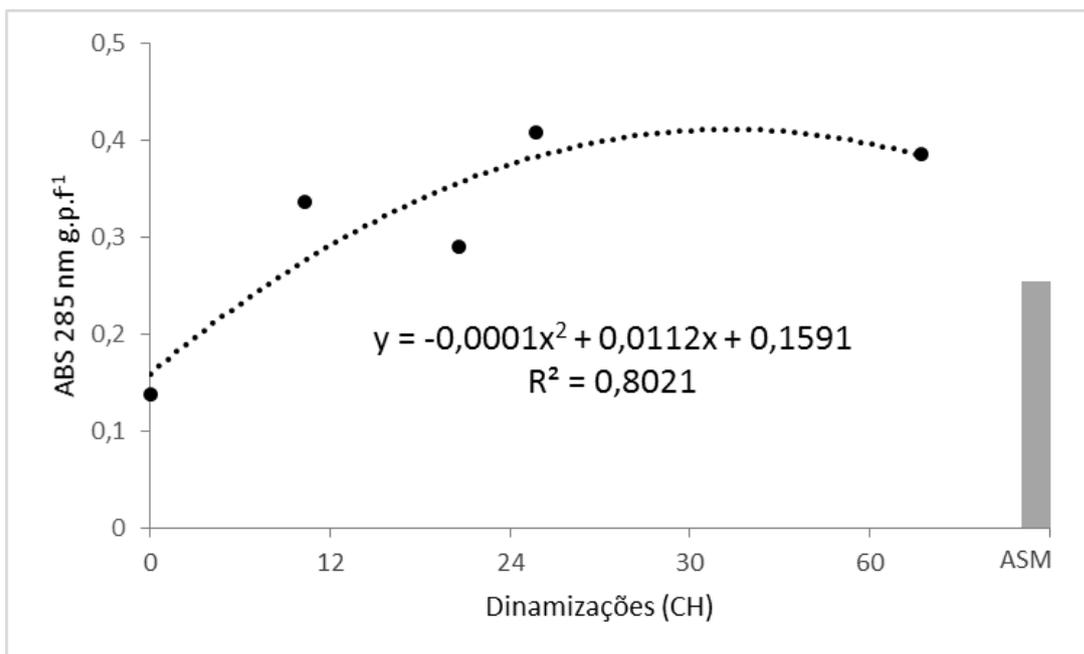
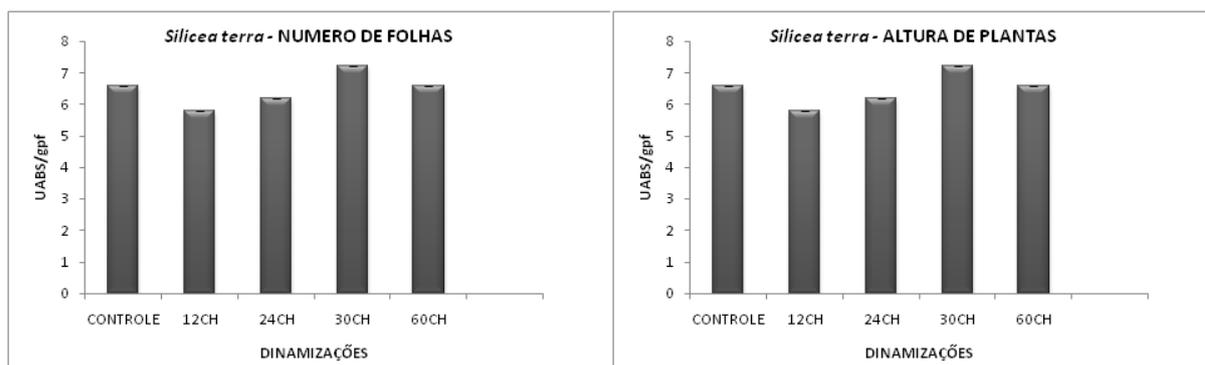


Figura 8- Indução de gliceolina em cotilédones de soja tratados com diferentes dinamizações homeopáticas de *Silícia terra*. ASM= acibenzolar-S-metil

Para os parâmetros biométricos, observou-se que o tratamento *S. terra* na dinamização 30CH causou um incremento no número de folhas, bem como na altura das plantas quando comparado com a testemunha, ao contrário das dinamizações 12CH e 24CH que causou a redução em ambos os parâmetros (Figura 9).



Figuras 9 - Parâmetros biométricos de altura de plantas e número de folhas em plantas de maracujazeiro tratadas com *Silicea terra*. Test-t.

4. CONCLUSÃO

O medicamento *Silicia terra* na dinamização 60CH causou redução de 22% na AACPD do CABMV.

A dinamização 12CH provocou aumento da atividade das enzimas catalase e peroxidase. Não houve influência na atividade de polifenoloxidase e a atividade da fenilalanina amônia-liase foi reduzida ao aplicar a dinamização 30CH.

Houve acúmulo de deoxiantocianidina e de gliceolina pelas dinamizações utilizadas de *S. terra*

O teor de clorofila não foi influenciado por nenhuma das dinamizações.

Para os parâmetros biométricos, observou-se que o tratamento na dinamização 30CH causou incremento no número de folhas, bem como na altura das plantas quando comparado com a testemunha, ao contrário das dinamizações 12CH e 24CH que causou a redução em ambos os parâmetros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que os medicamentos *C. carbonica* e *S. terra* são capazes de causar alterações em mecanismos da planta de maracujá, positiva ou negativamente, fazendo-se necessário a realização de novas pesquisas com estes medicamentos, para esta cultura, podendo ser alternativa de controle ou prevenção para o CABMV em maracujazeiro amarelo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ARNON, DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437905/?page=1>> Acesso em: 15, fevereiro, 2017.

BONATO, C.M. **Homeopatia simples: Alternativa para a agricultura familiar**. Marechal Cândido Rondon: Gráfica Escala, 2014. 50p.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.; OWUSU, K.A. comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, 64:351-359, 1999.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, 196:3143-151, 1991.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba: ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007. 138f. Tese (Doutorado em Agronomia).

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, 25:244-249, 1999.

NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao “*passion fruit woodiness virus*”. **Fitopatologia Brasileira**, 24:76-79, 1999.

OLIVEIRA, J.S.B. **Medicamentos homeopáticos, crescimento *in vitro* de *Pseudocercospora griseola* e fisiologia e bioquímica do feijoeiro**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. 151f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

OLIVEIRA, J.S.B.; MAIA, A.J. SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. BBONATO, C.M. CARNEIRO, S.M.T.P.G. PICOLI, M.H.S. Activation of biochemical defense mechanisms in bean plants for homeopathic preparations. **African Journal of Agricultural Research**, 9:971-981, 2014.

RABELO, L.C. **Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic vírus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot vírus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita**. Piracicaba: Escola Superior em Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2002. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

ROLIM, P.R.R.; TOFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; ROSSI, F. Preparados homeopáticos no controle da pinta preta do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, 23:749-753, 2005.

ROSSI, F. **Aplicação de preparados homeopáticos em morango e alface visando o cultivo com base agroecológica**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2005. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

SILVA, R.A. REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. (EDIÇÃO)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 49p.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G, FRANZENER, G. ASSI, L. SCWHAN-ESTRADA, K.R.F. KUHN, O.J. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, 10: 18-46, 2011.

TOLEDO, M.V.; STANGARLIN, J.R.; BONATO, C.M. Controle da Pinta Preta em tomateiro com preparados homeopáticos de própolis. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE HOMEOPATIA, II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AGROECOLOGIA, Curitiba, 2009. **Resumos...** Curitiba: Agroecologia 2009. p. 325-329.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M.; LEBEDA, P.P.A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 68:22-32, 2006.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 34:68-71, 2006.

ZIBETTI, A.P. MOREIRA, F.C.; FILHO, B.A.A.; BONATO, C.M.. Efeito de medicamentos homeopáticos em maracujazeiro (*Passiflorae sp*) infectado por *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae*. In: VI ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTIFICA CESUMAR. Maringá, 2009. **Resumos...** Maringá: Cesumar, 2009.