

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIELLE MARTINS MARCONDES

**EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA PARA  
O MANEJO DO OÍDIO (*Erysiphe polygoni*) EM FEIJÃO-DE-VAGEM,  
EM CASA DE VEGETAÇÃO**

TESE

PATO BRANCO

2016

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MARIELLE MARTINS MARCONDES**

**EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA PARA  
O MANEJO DO OÍDIO (*Erysiphe polygoni*) EM FEIJÃO-DE-VAGEM,  
EM CASA DE VEGETAÇÃO**

**TESE**

**PATO BRANCO**

**2016**

MARIELLE MARTINS MARCONDES

**EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA PARA  
O MANEJO DO OÍDIO (*Erysiphe polygoni*) EM FEIJÃO-DE-VAGEM,  
EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos

Coorientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marisa de Cacia  
Oliveira

Prof. Dr<sup>a</sup>. Rosangela  
Dalemolle-Giaretta

PATO BRANCO

2016

M321e Marcondes, Marielle Martins.  
Extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia para o manejo do oídio  
(Erysiphe polygoni) em feijão-de-vagem, em casa de vegetação / Marielle  
Martins Marcondes. -- 2016.  
95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos  
Coorientadora: Profa. Dra. Marisa de Cacia Oliveira  
Coorientadora: Profa. Dra. Rosangela Dallemole Giaretta  
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2016.  
Bibliografia: f. 83 – 93.

1. Fitopatologia. 2. Pragas agrícolas – Controle biológico. 3. Plantas –  
Doenças e pragas. I. Santos, Idalmir dos, orient. II. Oliveira, Marisa de  
Cacia, coorient. III. Giaretta, Rosangela Dallemole, coorient. IV.  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação  
em Agronomia. V. Título.

CDD (22 ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por  
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630  
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Título da Tese nº XXX**

### **EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA PARA O MANEJO DO OÍDIO (*Erysiphe polygoni*) EM FEIJÃO-DE-VAGEM, EM CASA DE VEGETAÇÃO**

por

**MARIELLE MARTINS MARCONDES**

Tese apresentada às 13 horas 30 min. do dia 05 de dezembro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR(a) EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de produção vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dr. Gilmar Franzener**  
UFFS

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Rosangela Dallemole-  
Giaretta**  
UTFPR  
Coorientadora

---

**Prof. Dr<sup>a</sup> Marisa de Cacia  
Oliveira**  
UTFPR  
Coorientadora

---

**Prof. Dr. Idalmir dos Santos**  
UTFPR  
Orientador

---

**Prof. Dr. Giovani Benin**  
Coordenador do PPGA

**A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa**

A minha família, que esteve comigo o tempo todo, compreendendo minhas dificuldades e acompanhando todo meu esforço;

Ao meu namorado (agora marido), que ficou ao meu lado, mesmo estando longe, sempre me dando força para continuar;

Aos meus amigos e colegas que me acompanharam durante todo o doutorado

Aos professores da UTFPR que me deram apoio e transmitiram seus conhecimentos;

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado durante toda essa caminhada;

Ao meu orientador Prof. Dr. Idalmir dos Santos, por ter me aceitado como sua orientada, por transmitir seu conhecimento durante o tempo em que estive na UTFPR, Pato Branco, por ter me ajudado e incentivado a elaborar um novo projeto, depois que os fatores ambientais não permitiram a execução do primeiro;

A minha coorientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa de Cacia Oliveira pela ajuda na interpretação de metodologias, pela colaboração e incentivo, principalmente durante as análises bioquímicas;

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosangela Dallemole Giaretta, pela ajuda nas metodologias dos experimentos, pela dedicação e contribuição nos trabalhos;

Aos demais professores e colaboradores da UTFPR que, de alguma maneira, contribuíram para meu crescimento e para o desenvolvimento da minha tese;

Aos meus amigos e colegas Beth Koltz, Carla D. Leite, Kelly Pazolini, Josi Arruda, Driéli Reiner, Patrícia Piacentini, Felipe Deifeld, Alana Chiarani, Rafael Baldin, Rúbia Camochena e Sandra Dalla Pasqua, pela ajuda em todas as etapas do meu trabalho e por todo apoio e carinho que recebi, desde o início do doutorado;

A os meu queridos pais, Luiz e Salete, por todo incentivo que me deram, sendo essenciais nessa minha caminhada e por todo amor dedicado a mim.

A minha querida irmã Mariana, a quem eu sempre recorria quando precisava de ajuda e apoio, estando sempre ao meu lado e compreendendo minhas dificuldades;

Ao meu marido, pelo companheirismo, incentivo e compreensão durante os momentos de dificuldade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin



## RESUMO

MARCONDES, Marielle Martins. Extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia para o manejo do oídio (*Erysiphe polygoni*) em feijão-de-vagem, em casa de vegetação. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

Produtos alternativos, como extratos vegetais, podem ser utilizados no controle de doenças de plantas visando reduzir o uso de fungicidas sintéticos, assim como a contaminação do meio ambiente e dos alimentos. Dentre as doenças que afetam as hortaliças de importância econômica no Brasil, encontra-se o oídio, e a espécie *Erysiphe polygoni* DC., pode causar a doença em plantas como o feijão-de-vagem, afetando toda a parte aérea. *Brassica* sp. têm se mostrado eficientes no manejo de doenças de plantas, causadas por patógenos veiculados ao solo e, resultados preliminares também têm indicado eficiência das mesmas no controle de oídio. A utilização de brássicas no controle de doenças de plantas, é um método alternativo natural e as substâncias extraídas das plantas na forma de extratos são mais baratas que os fungicidas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos extratos aquosos de canola (*Brassica napus* L.) e mostarda-da-índia (*B. juncea* L.), obtidos por diferentes métodos de extração no manejo do oídio em feijão-de-vagem, cultivado em ambiente protegido. Os experimentos avaliando o efeito dos extratos sobre a germinação de conídios, formação de apressório (*in vitro*) e AACPD da incidência e severidade da doença (casa de vegetação) foram em esquema fatorial 5 x 3 (concentração x métodos de extração) com cinco repetições. Os três métodos de extração foram aquoso simples, maceração e infusão e as cinco concentrações foram 0, 3, 6, 9 e 12% do respectivo extrato. Posteriormente, foram conduzidos novos experimentos para avaliar o efeito de compostos voláteis na germinação de conídios e formação de apressório, comparando os extratos aquosos simples de canola e mostarda-da-índia (9%) com leite cru (10%), enxofre inorgânico, o fungicida tiofanato metílico + clorotalonil e o Bion®, os três últimos nas doses comerciais. Além desses experimentos, foram conduzidos experimentos comparativos para avaliar a AACPD da incidência e da severidade da doença com os mesmos tratamentos citados anteriormente, exceto o Bion. Também foi avaliada a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja e a atividade metabólica dos extratos em tecidos de feijão-de-vagem, por meio das análises de proteínas totais, das enzimas fenilalanina amônia-liase e peroxidase e compostos fenólicos. As concentrações dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia que mais inibiram a germinação de conídios e a formação de apressório de *E. polygoni*, assim como a severidade do oídio, foram de 9 e 12%. De maneira geral, todos os métodos de preparo dos extratos foram eficientes no controle do oídio, mas, os que mais se destacaram foram o aquoso simples e macerado. Os extratos aquosos simples de canola e mostarda-da-índia a 9%, foram eficientes tanto na inibição da germinação de conídios quanto no controle da severidade do oídio, se igualando ao fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil. Esse comportamento demonstra que houve efeito de compostos voláteis com ação fungitóxica e pode ter ocorrido efeito direto, com ação fungistática. Pode ter ocorrido ainda indução de resistência, por meio da ativação das enzimas POX, SOD e PAL, resultando no acúmulo de compostos fenólicos e fitoalexinas.

**Palavras-chave:** *Brassica* sp., controle alternativo, indução de resistência, *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

MARCONDES, Marielle Martins. Aqueous extracts of canola and mustard-of-india for management powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) in green bean, in greenhouse. 97 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná. Pato Branco, 2016.

Intensive use of chemicals in agriculture, despite increasing crop productivity, has generated concern to producers and consumers, as have associated with degradation and contamination of the environment and also contamination of food. Alternative products such as plant extracts in the control of plant diseases, aimed at reducing the use of synthetic fungicides. Among the diseases that affect vegetables, such as green bean, is powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC.), which can affect the entire shoot. *Brassica* sp. have proven effective in the management of plant diseases caused by soil borne pathogens and preliminary results have also shown the same effectiveness in controlling powdery mildew. The use of brassicas in the control of plant diseases, it is a natural alternative method and as the plant extracts are cheaper than fungicides. The objective was to evaluate the effect of aqueous extracts of canola (*Brassica napus* L.) and mustard-of-india (*B. juncea* L.), obtained by different extraction methods in the management of powdery mildew in green bean, grown in a protected environment. The experiments evaluating the effect of extracts on spore germination, appressorium formation (*in vitro*) and AUDPC incidence and severity of disease (greenhouse) were in a factorial 5 x 3 (concentration x extraction methods) with five repetitions. Three extraction methods were simple aqueous, maceration and infusion and five concentrations were 0, 3, 6, 9 and 12% of its extract. Also evaluated the phytoalexin synthesis in soybean cotyledons and the metabolic activity of tissue extracts of green bean, through the analysis of total proteins, enzyme phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase and phenolic compounds. The concentrations of the aqueous extract of canola and mustard-of-india more inhibited the germination of conidia and the formation of appressoria *E. polygoni*, as well as the severity of powdery mildew were 9 and 12%. In general, all methods of preparation of the extracts were effective in controlling powdery mildew, but those who stood out were simple aqueous and macerated. The simple aqueous extracts of canola and mustard -of-india 9%, were both effective in inhibiting spore germination and in controlling the severity of powdery mildew, equaling the commercial fungicide. This behavior shows that there was effect of voléteis compounds fungitoxic action and may have occurred direct effect, with fungistatic action. It may have also been induced resistance through the activation of POX, SOD and PAL enzymes, resulting in the accumulation of phenolic compounds and phytoalexins.

**Keywords:** *Brassica* sp., alternative control, induction of resistance, *Phaseolus vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – (A) Extratos aquosos de mostarda-da-índia preparados pelos métodos: infusão, maceração e aquoso simples e diluídos nas concentrações de 3, 6, 9 e 12%. UTFPR. (B) Lâmina de vidro colocada sobre um suporte, dentro de uma placa de Petri. (C) Folha com esporulação de *E. polygoni* (colônia de 12 dias). UTFPR, Pato Branco 2014.....35
- Figura 2 – Conídio de *E. polygoni* com formação do tubo germinativo (1) e apressório (2). UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....35
- Figura 3 – (A) e (B) Germinação e semeadura do feijão-de-vagem cultivar macarrão rasteiro baixo dos experimentos com canola e mostarda-da-índia, respectivamente, no primeiro cultivo. (C) Inóculos de oídio entre os blocos. UTFPR, Pato Branco, 2014.....37
- Figura 4 – Teste de fitoalexinas em cotilédones de soja. (A) Tramentos preparados para a aplicação; (B) cotilédones de soja com uma secção de 10 mm de diâmetro, feitas com furador manual; (C) raspagem da secção utilizando uma lâmina; (D) cotilédones dentro da placa de Petri, sob papel filtro umedecido; (E) agitação dos cotilédones em frascos erlenmeyers contendo água estéril, para extração da gliceolina; (F) filtragem dos cotilédones para leitura. UTFPR, Pato Branco – PR, 2014.....39
- Figura 5 – Métodos de preparo dos extratos aquosos de canola, sobre a germinação de conídios de *E. polygoni*, nos experimentos I e II.....45
- Figura 6 – Efeito dos extratos aquosos de canola na germinação de conídios de *E. polygoni*, em dois experimentos. (A), (B) e (C) germinação de conídios tratados com extratos preparados sob infusão, maceração e aquoso simples, respectivamente, no experimento I e; (D) germinação de conídios no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....46
- Figura 7 – Efeito dos extratos aquosos de canola na formação de apressório de *E. polygoni*, em dois experimentos. (A) e (B) Concentração dos extratos aquosos obtidos sob infusão e macerado, respectivamente, no experimento I. (C) Concentração dos extratos aquosos de canola no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....47
- Figura 8 – Métodos de preparo dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, nos experimentos I e II, sobre a germinação de conídios de *E. polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....49
- Figura 9 – Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na germinação de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. (A), (B) e (C) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento I. (D), (E) e (F) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....50
- Figura 10 – Métodos de preparo dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, nos experimentos I e II, sobre a formação de apressório em conídios germinados de *E. polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....51
- Figura 11 – Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na formação de apressório em conídios germinados de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. (A), (B) e (C) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento I. (D), (E) e (F) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....52
- Figura 12 – Efeito dos extratos aquosos simples de canola e mostarda-da-índia, na concentração de 9%, comparados com fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico, leite cru (*in natura*) e o Bion®, na germinação e formação de apressório de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014..... 55
- Figura 13 – Efeito das concentrações dos extratos aquosos de canola na AACPD da incidência (A) e

(C) e da severidade (B) e (D) de <i>E. polygoni</i> , no primeiro e segundo cultivo do feijão-de-vagem, e efeito dos métodos de preparo dos extratos aquosos de canola na AACPD da severidade (E) de <i>E. polygoni</i> , no segundo cultivo, em casa de vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	58
Figura 14 – Médias de dados decisiais de temperaturas máxima e mínima, no primeiro e segundo cultivo, em casa-de-vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	59
Figura 15 – Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na AACPD da incidência (A) e (C) e da severidade (B) e (D) de <i>E. polygoni</i> , em casa de vegetação, no primeiro e segundo cultivo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.....	61
Figura 16 – Efeito dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, do fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico e leite de vaca <i>in natura</i> , na AACPD da severidade e da incidência de <i>E. polygoni</i> , em casa de vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.....	63
Figura 17 – Folhas de feijão-de-vagem com aplicação dos tratamentos: (T1) testemunha água; (T2) extrato aquoso simples de canola; (T3) extrato aquoso simples de mostarda-da-índia; (T4) Tiofanato-metílico + clorotalonil; (T5) Enxofre inorgânico; (T6) Leite cru. UTFPR, Pato Branco – PR, 2015.....	63
Figura 18 – Indução de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015.....	66
Figura 19 – Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostrada-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese de peroxidase ( $\Delta$ ABS min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos. (A e C) O primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em seis tempos distintos, e (B e D) o segundo com a inoculação de <i>E. polygoni</i> , coletas em cinco tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	69
Figura 20 – Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostrada-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese de superóxido dismutase (U SOD mg <sup>-1</sup> proteína) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em 6 tempos distintos, e o segundo com a inoculação de <i>E. polygoni</i> , coletas em 5 tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	72
Figura 21 – Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostrada-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase (U Abs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em seis tempos distintos, e o segundo com a inoculação de <i>E. Polygoni</i> e coletas em cinco tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	75
Figura 22 – Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostrada-da-índia, leite cru e o Bion® no acúmulo de compostos fenólicos (ABS mg <sup>-1</sup> 100g <sup>-1</sup> de ácido gálico) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em 6 tempos distintos, e o segundo com a inoculação de <i>E. polygoni</i> , coletas em 5 tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quadrado médio para germinação de conídios (%) e formação de apressório (%) em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	44
Tabela 2 – Análise de variância para germinação de conídios (%) e formação de apressório (%) em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de mostarda-da-índia. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	48
Tabela 3 – Análise de variância para a AACPD da incidência e da severidade de <i>Erysiphe polygoni</i> , em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de canola, em dois cultivos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	57
Tabela 4 – Análise de variância para a AACPD da incidência e da severidade de <i>Erysiphe polygoni</i> , em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, em dois cultivos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.....	60
Tabela 5 – Análise de variância para a atividade enzimática da peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e fenilalanina amônia-liase (FAL) e quantificação de compostos fenólicos em folhas de feijão-de-vagem não inoculadas e inoculadas com <i>E. polygoni</i> , em função do tempo de coleta (TC) e dos tratamentos, testemunha (água), testemunha positiva (água + inóculo), extrato aquoso simples de canola, extrato aquoso simples de mostarda-da-índia (9%), leite cru e Bion. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	68
Tabela 6 – Efeito da interação tempo x tratamentos na síntese da enzima peroxidase ( $\Delta$ ABS min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	70
Tabela 7 – Efeito da interação tempo x tratamentos na síntese da enzima peroxidase ( $\Delta$ ABS min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> prot), no experimento com a inoculação de <i>E. Polygoni</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	71
Tabela 8 – Efeito da interação entre tempo x tratamentos na síntese da enzima superóxido dismutase (U SOD mg <sup>-1</sup> proteína), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	73
Tabela 9 – Efeito da interação entre tempo x tratamentos na síntese da enzima superóxido dismutase (U SOD mg <sup>-1</sup> proteína), no experimento com a inoculação de <i>E. Polygoni</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	74
Tabela 10 – Efeito da interação tempo x tratamentos, na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase (U Abs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	76
Tabela 11 – Efeito da interação tempo x tratamentos, na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase (U Abs min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína), no experimento inoculado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. 76	76
Tabela 12 – Efeito da interação tempo x tratamentos, no acúmulo de compostos fenólicos (ABS mg <sup>-1</sup> 100g <sup>-1</sup> de ácido gálico), no experimento sem a inoculação de <i>E. Polygoni</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	79
Tabela 13 – Efeito da interação tempo x tratamentos, no acúmulo de compostos fenólicos (ABS mg <sup>-1</sup> 100g <sup>-1</sup> de ácido gálico), no experimento inoculado com <i>E. Polygoni</i> . UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....	79

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

CEASA/PR	Centrais Estaduais de Abastecimento do Paraná S.A.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FAO	Food and Agriculture Organization
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
AACPD	Área abaixo da curva de progresso da doença
RSA	Resistência sistêmica adquirida
RSI	Resistência sistêmica induzida
FAL	Fenilalanina amonia-liase
POX	Peroxidase
SOD	Superóxido dismutase
J2	Juvenis de segundo estágio
ATP	Adenosina trifosfato

## LISTA DE ABREVIATURAS

sp.	Espécie
t	Tonelada
°C	Graus Célsius
µm	Micrômetro
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligrama
g	grama
mm	milímetro
h	hora
rpm	Rotação por minuto
min	Minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
nm	Nanômetro
v	Volume
mM	Milimol
µL	Microlitro
µKat	Microkatal
µg	Micrograma
Prot.	Proteína
U	Unidade
Abs	Absorbância
atm	Atmosfera

## LISTA DE SÍMBOLOS

®  
Σ

Registrado  
Somatório



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 A CULTURA DO FEIJÃO-DE-VAGEM.....	19
2.2 ASPECTOS GERAIS DO OÍDIO.....	20
2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.4 SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA.....	21
2.5 CONTROLE DA DOENÇA.....	22
2.5.1 Uso de extratos no controle de oídios.....	23
2.5.2 Controle de doenças de plantas com a utilização de <i>Brassica</i> spp.....	26
2.5.3 Indução de resistência em plantas por extratos vegetais.....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS .....	33
3.2 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA .....	33
3.3 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA .....	33
3.4 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA NA GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE <i>Erysiphe polygoni</i> .....	34
3.5 USO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O OÍDIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	36
3.6 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA .....	38
3.7 ATIVIDADE METABÓLICA EM TECIDOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM TRATADOS COM EXTRATOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA.....	40
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTE NOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA NA GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE <i>Erysiphe polygoni</i> .....	44
4.1.1 Extratos aquosos de canola na germinação e formação de apressório de <i>E. Polygoni</i> .....	44
4.1.2 Extratos aquosos de mostarda-da-índia na germinação e formação de apressório de <i>E. polygoni</i> .....	48
4.1.3 Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia com o fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico, leite cru ( <i>in natura</i> ) e o Bion®, na germinação e formação de apressório de <i>E. Polygoni</i> .....	54
4.2 USO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O OÍDIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	56

4.2.1 Extratos aquosos de canola.....	56
4.2.2 Extratos de mostarda-da-índia .....	60
4.2.3 Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia com o fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico e leite cru ( <i>in natura</i> ), em casa de vegetação.....	62
4.3 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA .....	65
4.4 ATIVIDADE METABÓLICA EM TECIDOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM TRATADOS COM EXTRATOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA.....	67
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>94</b>
ANEXO A – ESCALA DIAGRAMÁTICA UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DO OÍDIO EM FEIJÃO-DE-VAGEM.....	95

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por produtos alternativos, como extratos de plantas, produtos naturais e eficientes no controle de doenças de plantas, tem aumentado nos últimos anos, visando reduzir o uso de fungicidas sintéticos e que não apresentem os efeitos negativos destes últimos à saúde humana e ao meio ambiente. Dentro desse contexto, as pesquisas na área agrícola exercem um papel fundamental na tentativa de contribuir com os agricultores para que adotem um modelo de agricultura sustentável.

As hortaliças ocupam um importante papel na agricultura brasileira, principalmente em propriedades de exploração familiar. Dentre as hortaliças cultivadas no país, o feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre as dez mais importantes. Porém, o cultivo de hortaliças é considerado uma atividade de alto risco em função de problemas fitossanitários e maior suscetibilidade a condições climáticas adversas. Além disso, os fatores ambientais, as práticas culturais e as diversas cultivares podem afetar a produtividade das culturas. Na questão fitossanitária, ainda há poucas informações sobre a resistência das cultivares de feijão-de-vagem às doenças, e o controle químico ainda é de difícil acesso, pois existem poucos produtos registrados para a cultura. Uma das principais doenças do feijão-de-vagem, em especial no cultivo em ambiente protegido, é o oídio, causado pelo fungo *Erysiphe polygoni* (DC.). O oídio pode afetar toda a parte aérea da planta, prejudicando seu desenvolvimento, sendo que, no caso de maior severidade da doença, as vagens podem deformar-se e cair antes da maturação. Os danos econômicos mais severos ocorrem se a doença se manifestar no início do ciclo da cultura (KIMATI et al., 2005). O melhoramento genético para resistência de plantas ao oídio tem sido dificultado, pois o fungo apresenta diversos patótipos, por isso, outros métodos de controle da doença precisam ser adotados. Além de culturais e químico, podem ser utilizados métodos alternativos, como o uso de extratos de plantas (CARNEIRO et al., 2007; YANG et al., 2009; SEGARRA et al., 2009). Os extratos de plantas atuam no controle de doenças causadas por fitopatógenos por meio da ação fungitóxica direta ou pelo aumento no nível de resistência às doenças da cultura tratada.

As brássicas têm se mostrado eficientes no manejo de diversas

doenças de plantas, principalmente causadas por patógenos veiculados ao solo (NEVES et al., 2007; WEERAKOON et al., 2012) e entre as espécies testadas, *Brassica napus* L. e *B. juncea* L. mostraram-se eficientes (SMOLINSKA et al., 2003; BARROS et al., 2014). No entanto, há poucos estudos sobre os efeitos dessas plantas em patógenos de parte aérea, principalmente no manejo do oídio em feijão-de-vagem. Portanto, o extrato preparado a partir do pó dessas espécies vegetais pode ser uma possível alternativa no controle de doenças foliares, pois produzem compostos oriundos do metabolismo secundário, conhecidos como glucosinolatos. Estes são precursores dos isotiocianatos, considerados eficientes biocidas naturais (KIRKEGAARD; SARWAR, 1998; SMOLINSKA et al., 2003).

A utilização de brássicas no controle de doenças de plantas, além ser um método alternativo natural, permite ao agricultor reduzir custos, pois, as substâncias extraídas das plantas na forma de extratos são mais baratas que os fungicidas. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos extratos aquosos de canola (*Brassica napus* L.) e mostarda-da-índia (*B. juncea* L.), obtidos por diferentes métodos de extração no manejo do oídio em feijão-de-vagem, cultivado em ambiente protegido.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO FEIJÃO-DE-VAGEM

O feijão-de-vagem é da família Fabaceae e pertence à mesma espécie do feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L. diferindo deste porque suas vagens são colhidas ainda imaturas, com baixo teor de fibras e utilizadas na alimentação humana tanto de maneira industrializada como *in natura* (FILGUEIRA, 2003). Esta hortaliça é uma espécie predominantemente autógama, domesticada há mais de sete mil anos em dois centros de origem, a Mesoamérica (México e América Central) e a Região Andina (KAPLAN, 1981).

O feijão-de-vagem é uma hortaliça de grande importância econômica e social no Brasil, sendo comercializado o ano todo (PEIXOTO et al., 2001; VIDAL et al., 2007), com menor oferta do produto nos meses de julho a outubro (BASSO et al., 2012). Além do Brasil, essa hortaliça é consumida em diversos outros países, com produção mundial estimada em 6,5 milhões de toneladas ano<sup>-1</sup> (FAO, 2010).

Segundo dados do IBGE (2006), a produção anual do Brasil foi de aproximadamente 57 mil toneladas de feijão-de-vagem, sendo que deste montante, 86,3% foram com a aplicação de agrotóxicos. Em 2012, o estado do Paraná produziu 16,04 mil t e a CEASA/PR comercializou 5,33 mil t, sendo a sétima hortaliça fruto mais comercializada, representando 2,74% (CEASA, 2012).

As plantas de feijão-de-vagem cujo crescimento é determinado apresentam caule ereto, curto, ramificado, inflorescências terminais, além de laterais. Os frutos são vagens de polpa espessa e formato afilado, dentro das quais se desenvolvem as sementes (PEIXOTO et al., 2001; FILGUEIRA, 2003). As vantagens das cultivares arbustivas são o menor ciclo e a dispensa do tutoramento. As colheitas são concentradas, podendo chegar, no máximo a cinco durante a safra. Outra vantagem é a possibilidade de efetuar uma única colheita, arrancando as plantas no campo para posterior separação das vagens (PINTO et al., 2001).

O cultivo do feijão-de-vagem é favorecido por temperaturas do ar na faixa de 18 a 30 °C durante seu ciclo de desenvolvimento, não tolerando temperaturas elevadas, nem geadas (PRELA; RIBEIRO, 2002). Devido essas exigências climáticas, em regiões subtropicais, essa hortaliça é cultivada em

ambiente externo, em duas épocas, na primavera e no outono. No entanto, durante o outono, a baixa radiação solar, a baixa temperatura do ar e o excesso de chuvas em algumas regiões são fatores limitantes para a produção de feijão-de-vagem no ambiente externo. Com isso, podem acarretar perdas qualitativas e quantitativas, a partir do mês de maio, época em que o preço da vagem na etapa de comercialização é maior (FELTRIM et al., 2006).

Partes dessas limitações ambientais podem ser amenizadas com o cultivo do feijão-de-vagem em ambiente protegido, no qual a temperatura do ar é maior e há proteção contra chuva, reduzindo o molhamento foliar e desfavorecendo o estabelecimento de algumas doenças foliares, porém, esse cultivo acaba favorecendo outras, a exemplo do oídio, causado pelo fungo *Erysiphe polygon* DC. ex Merat. (HELDWEIN et al., 2010).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS DO OÍDIO

Os oídios são doenças causadas por fungos evoluídos e biotróficos. Os oídios reduzem a fotossíntese, aumentam a respiração e a transpiração das plantas e, com isso, diminuem o potencial produtivo das culturas. A doença ocorre em diferentes regiões do mundo todo e na maioria das espécies vegetais cultivadas, porém, dificilmente causam a morte das plantas (AGRIOS, 2005), mas danos econômicos severos podem ocorrer se a doença se manifestar no início do ciclo das culturas (KIMATI et al., 2005).

## 2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

O fungo *E. polygoni* pertence à ordem Erysiphales, família Erysiphaceae e subdivisão Ascomycotina, apresentando grande número de hospedeiros. Os agentes causais dos oídios, na fase sexuada, são ascomicetos e na fase assexuada são fungos mitospóricos (STADNIK, 2001).

A forma assexual corresponde ao gênero *Oidium* Link (1824), sendo encontradas as espécies *Oidium balsamii* Mont. ou *Oidium erysiphoides* Fr. O fungo produz micélio epifítico, septado, hialino, ramificado, com hifas que penetram nas células epidérmicas e produzem haustórios (STADNIK, 2001; KIMATI et al., 2005).

Os conidióforos são curtos, eretos e septados, com conídios cilíndricos a ovalados, unicelulares, hialinos, produzidos em cadeia, com 30-45 x 10-20 µm. Na germinação, os conídios apresentam tubos germinativos com apressório lobado, inseridos apical ou lateralmente, curtos a moderadamente longos, com rápido desenvolvimento (STADNIK, 2001).

Na fase sexual, *E. polygoni* apresenta cleistotécios, que são estruturas esféricas, de coloração escura, com aproximadamente 180 µm de diâmetro, possuem apêndices e não são ostiolados (SARTORATO; YORINORI, 2001). Após o rompimento ou desintegração da parede do cleistotécio, são liberados os ascos. Os ascos, com dimensões de 50-75 x 26-40 µm, apresentam ascósporos hialinos, elípticos ou ovóides, medindo 20-30 x 10-12 µm e podem conter de três a oito ascósporos (SARTORATO; YORINORI, 2001; KIMATI et al., 2005). Por se tratar de um patógeno biotrófico, sua sobrevivência só é possível na presença do hospedeiro. Na ausência da cultura, o patógeno pode garantir sua sobrevivência por meio de plantas alternativas ou voluntárias, como a couve, a couve-flor, o cajueiro e a ervilha (LOPEZ; RIVERA, 2001).

A disseminação dos conídios ocorre facilmente pelo vento, chuva ou por insetos. Elevadas precipitações são desfavoráveis à produção de conídios, pois podem danificar os conidióforos (KIMATI et al., 2005). Os conídios germinam em temperaturas ótimas de 20 a 25 °C, com o desenvolvimento da doença ocorrendo preferencialmente na temperatura de 24 °C (BIANCHINI et al., 1997; TUMURA et al., 2013). A luminosidade também favorece a formação dos conídios, assim como a sua germinação. Porém, a germinação do oídio é inibida pela água na superfície das plantas durante períodos prolongados. Apenas uma fina rede micelial cresce sobre a superfície foliar em forma de colônias, assim, cada colônia forma inúmeros haustórios que retiram nutrientes das células epidérmicas e mesofílicas, sem, no entanto, matá-las, garantindo a produção de conidióforos e conídios (SARTORATO; YORINORI, 2001).

## **2.4 SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA**

Os sintomas iniciam-se como pequenas manchas verdes mais escuras na face superior da folha, que logo ficam cobertas por um crescimento branco e

pulverulento, constituído por micélio e esporos do fungo. A folha inteira pode ser coberta pelo micélio branco, causando senescência prematura. Em caso de infecções severas, as folhas podem ficar amareladas e retorcidas, podendo ocorrer desfolhamento prematuro das plantas. Além das folhas, o patógeno pode atacar caule, ramos e vagens, tornando as últimas mal formadas e menores, podendo cair antes da maturação. Quando o crescimento pulverulento do fungo é removido, o tecido afetado apresenta coloração parda ou púrpura (SARTORATO; YORINORI, 2001; KIMATI et al., 2005;).

## **2.5 CONTROLE DA DOENÇA**

O melhor método de controle do oídio é a prevenção, de maneira geral, e as medidas de controle incluem práticas culturais, o uso de cultivares resistentes e a aplicação de produtos químicos ou naturais.

Entre as práticas culturais, a mais relevante é evitar o cultivo do feijão-de-vagem em locais com baixa umidade do ar e do solo. Havendo necessidade de controle químico, pode ser feito com aplicação dos fungicidas triforine ou tiofanato-metilico. O controle químico tem se mostrado eficiente e deve ser realizado no início dos primeiros sintomas da doença, sendo necessárias duas ou três aplicações. Os oídios, de maneira geral, podem ser controlados por meio de cultivares resistentes, porém, para o feijão-de-vagem, não há disponibilidade de genótipos resistentes, uma vez que a doença não tem recebido destaque em programas de melhoramento (KIMATI et al., 2005).

Nasir et al. (2014), citam em sua revisão que os produtos a base de enxofre inorgânico são os fungicidas mais antigos que existem e derivados do ácido ditiocarbâmico. Estes fungicidas são considerados seguros e baratos, sem qualquer risco de resistência e não fitotóxicos, com algumas exceções (mancozeb e propinebe) e promovem razoável controle do oídio, porém podem danificar as plantas, provocando escaldadura de flores e frutos jovens em condições muito quentes, acima de 30 °C.

No trabalho de Medeiros et al. (2012), o leite de vaca autoclavado foi aplicado de maneira preventiva em folhas de abobrinha, nas concentrações de 10 e 30% e, três horas depois inocularam o oídio. Os resultados encontrados foram de



que apenas a concentração de 30% diferiu do tratamento testemunha, com 29% de inibição da germinação de conídios. No tratamento curativo, em casa de vegetação, a mesma concentração do leite fresco reduziu 87,8% a AACPD da severidade do oídio em abobrinha. Nesse trabalho os autores afirmam que todas as fontes de leite têm potencial de controle de oídio, e que essas fontes favorecem a sobrevivência de outros fungos e de colônias bacterianas que podem ter potencial no controle do oídio. Porém, a eficiência dessas fontes é reduzida quando o leite passa por tratamento térmico. O leite fresco de vaca, a 20%, também foi eficiente contra o oídio em mudas de eucalipto, controlando 36,5% a severidade da doença. O controle com o fungicida piraclostrobina + epoxiconazol, entretanto, foi de 92% (BIZI et al., 2008).

### **2.5.1 Uso de extratos no controle de oídios**

As plantas apresentam uma diversidade de substâncias em sua composição e muitas com potencial fungicida ou fungistático. Devido à presença dessas substâncias, algumas plantas merecem ser estudadas para serem utilizadas por agricultores, podendo servir como matéria-prima para síntese de novos produtos ou ainda serem utilizadas na indução de resistência de plantas a doenças (GARCIA et al., 2012).

O extrato de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), por exemplo, tem sido estudado por vários autores para controle de fitopatógenos como os fungos *E. polygoni* em feijoeiro (CARNEIRO et al., 2007), *Phaeoisariopsis griseola* (CARNEIRO et al., 2008), *Fusarium oxysporum* Schlecht (HANAA et al., 2011) e o nematoide *Heterodera glycines* Ichinohe (SILVA et al., 2008). O principal composto presente no nim é a azadiractina, encontrada principalmente nas sementes, com capacidade de controle de fitopatógenos, sendo biodegradável e de persistência curta no meio ambiente, principalmente por causa da rápida degradação pela luz solar (MARTINEZ, 2002 ; BOURSIER et al., 2011).

Carneiro et al. (2007) testaram o óleo de nim, de uma marca comercial com 0,5% de azadiractina, e extrato de sementes nim no controle do oídio do feijoeiro. Para o preparo do extrato foram trituradas as sementes com água destilada estéril e deixadas em repouso e após um período de 20 a 24 h o caldo foi filtrado. O

óleo já aplicado preventivamente, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5%, reduziu o número de manchas e sinais do patógeno nas folhas quando comparados com a testemunha, principalmente quando aplicado 6 h antes da inoculação, mas foram inferiores ao fungicida comercial. Além disso, as concentrações de 1 e 1,5% causaram fitotoxicidade em algumas plantas. Quando aplicado após a inoculação do patógeno, por outro lado, o óleo de nim foi tão eficiente quanto o fungicida, com redução média de 97% do número de manchas/folha. Na aplicação do óleo de nim após o aparecimento dos sintomas, o controle também foi semelhante ao fungicida, mostrando ação direta do produto sobre o patógeno. O extrato de sementes de nim nas proporções de 35, 25 e 15 g L<sup>-1</sup> foram tão eficientes quanto o fungicida quando pulverizado após a inoculação do patógeno, com redução de 98% dos sintomas da doença.

O efeito de extratos de nim e do óleo de canola foram testados no controle do agente causal de oídio em roseiras (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae* Woron.) e apresentaram controle satisfatório da doença (PASINI et al., 1997). Piva (2013) testou extratos de pó de canola obtidos por diferentes formas de extração (alcoólico, infusão, maceração e extrato aquoso), em diferentes concentrações (0, 3, 6, 9 ou 12%), no controle do oídio do pepino, e verificou que o melhor controle foi do extrato obtido por maceração na concentração de 12%, com redução na incidência e severidade da doença acima de 50% e 90%, respectivamente.

Segundo dados do IAPAR, o óleo emulsionável de nim controlou o oídio em feijão de maneira semelhante ao fungicida triforine, também recomendado para o controle de oídio na cultura. Já o extrato de sementes de nim aplicado antes da inoculação do oídio, controlou a doença, mas não tão bem como o fungicida. Quando aplicado após a inoculação do oídio, o controle se igualou ao fungicida triforine (CARNEIRO, 2008).

Outro extrato testado no controle da doença foi o extrato etanólico de *Rheum officinale* Baillon, comercializado na China, foi testado no controle de oídio (*Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff, (2000)) em pepino, na formulação líquida, composta por 5 g L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo phycion, além de outras substâncias. As doses testadas foram de 6,25; 10; 20 e 50 mg L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo (i.a), comparando com o fungicida padrão triadimefon 15% WP. Nos experimentos em casa de vegetação, as doses de 50 e 20 mg L<sup>-1</sup>, tiveram a

mesma eficiência do fungicida, com redução no número de colônias de *P. xanthii* acima de 90% para os respectivos tratamentos, em comparação com o tratamento testemunha. Nos experimentos à campo, as doses de 20 e 50% apresentaram eficiência melhor ou igual ao fungicida triadimefon 15% WP (YANG et al., 2009).

O “physcion”, um derivado de antraquinona, tem sido relatado por apresentar atividade antifúngica, assim como também o crisofanol e emodina, e o efeito de inibidor dessas substâncias depende da presença dos substituintes OH, OMe, e OAc no Carbono 1 (C1) e Carbono 8 (C8) (AGARWAL et al., 2000). O physcion e o crisofanol também foram isolados de raízes de *Rumex crispus* L. e foi necessária a dose de 0,48 mg mL<sup>-1</sup> e 4,7 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para controlar o oídio da cevada em 50%. A atividade do physcion e do crisofanol foi tanto de proteção quanto curativa. As duas substâncias também foram eficientes contra o oídio do pepino, sendo que os tratamentos com o crisofanol (100 mg mL<sup>-1</sup>) e physcion (parietina) (30 e 10 mg mL<sup>-1</sup>) resultaram no controle do oídio superior a 60% em condições de casa de vegetação (CHOI et al., 2004).

Outros extratos testados no controle do oídio em pepino (*Sphaerotheca filiginea* Schltldl.), em casa de vegetação, foram de folhas de *Reynoultiu sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, preparado por imersão do pó de folhas por 1 h em água fria, sob agitação constante e também a formulação líquida comercial de extrato de *R. sachalinensis* (Milsana®), diluído com água até uma concentração final de 2%. Na comparação do extrato de *R. sachalinensis* com o fungicida miclobutanil, a severidade do oídio em folhas de pepino foi reduzida, e a eficiência do extrato e do fungicida foi acima de 90%, em comparação com a testemunha. Quando comparado com o uso de enxofre, a eficiência do extrato de *R. sachalinensis* foi de 88,8%, e do enxofre foi de 79,3%. Os extratos de *R. sachalinensis*, tanto formulado como o não formulado, apresentaram eficiência contra o oídio mesmo sob alta pressão da doença (KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS ; SCHMITT, 1999).

Zhang et al. (2008) avaliaram o efeito do extrato etanólico bruto a partir de folhas frescas de *Robinia pseudoacacia* Linn, nas doses de 10, 20 e 80 mg mL<sup>-1</sup>, no controle do oídio do pepineiro. Os resultados mostraram que houve atividade antifúngica do extrato sobre o oídio, sendo que a maior dose apresentou o maior efeito protetor, com eficiência de 81,25%. Em outro experimento, comparando quatro

solventes, em água, éter de petróleo, acetato de hexila e n-butyl álcool, em diferentes diluições, o tratamento com o extrato em água, na diluição de 10 mg mL<sup>-1</sup> apresentou maior efeito protetor quando comparado com os demais. O efeito do extrato em água também foi maior com o aumento da dose e não apresentou diferença em comparação com o triadimefon. *In vitro*, o extrato de *R. pseudoacacia* inibiu a germinação de conídios de *S. fuliginea* em até 50% (20 mg mL<sup>-1</sup>).

### **2.5.2 Controle de doenças de plantas com a utilização de *Brassica* spp.**

O uso de *Brassica* spp. já faz parte de diversos estudos com doenças de plantas, especialmente para o controle de patógenos veiculados ao solo (LARKIN; GRIFFIN, 2007; GUERRERO-DIAZ et al., 2013; BARROS et al., 2014). Estudos realizados com diferentes espécies de brássicas indicam que o principal modo de ação dessas plantas no controle de doenças é por meio de compostos denominados isotiocianatos (SMOLINSKA et al., 2003; WU et al., 2011). Os isotiocianatos são substâncias muito eficientes como biocidas naturais e resultam da hidrólise enzimática dos glucosinolatos voláteis pela ação da enzima mirosinase (SMOLINSKA et al., 2003; AHUJA et al., 2010). Essa reação só ocorre quando há ruptura do tecido, pois, os glucosinolatos e a mirosinase são produzidos em locais distintos da planta (SMOLINSKA; HORBOWICZ, 1999).

Os glucosinolatos estão normalmente presentes em todas as partes da planta, com concentrações variáveis, que vão depender dos diferentes tecidos vegetais e estágios de desenvolvimento da planta. Comumente, os níveis mais elevados de glucosinolatos foram encontrados em folhas jovens e tecidos reprodutivos, tais como siliquis e sementes, ao passo que o teor de glucosinolatos declinou nas folhas maduras (PORTER et al., 1991). Por outro lado, na revisão de Martínez-Ballesta et al. (2013), baseados na determinação do teor de glucosinolatos nas raízes e brotos de 29 espécies de plantas, há trabalhos relatando que as raízes têm concentrações mais elevadas e maior diversidade de glucosinolatos que os brotos (DAM et al., 2009).

Bellostas et al. (2004) relataram em seu trabalho, que os teores de glucosinolato encontrados nas espécies de *B. caricata*, *B. rapa*, *B. nigra* e *B. juncea* na raiz, é maior nos primeiros estágios da planta, em proporção a outros órgãos,

porém, há uma redução no teor de glucosinolatos da raiz ao longo do ciclo de crescimento da planta. O elevado teor de glucosinolato nas raízes, na primeira fase de crescimento de cada espécie, poderia ser uma alternativa interessante de utilizá-los, no entanto, a quantidade de biomassa das raízes pode não ser suficiente para determinada utilização como a fumigação e preparo de extratos. Morra e Kirkegaard (2002) avaliaram a liberação de isotiocianatos em brássicas incorporadas ao solo e observaram a presença dos isotiocianatos 2-propenil nos brotos, 2-propenilo e 2-feniletilo nas raízes de *B. juncea*. Já *B. napus* continha os isotiocianatos 3-butenilo e 4-pentenil nos brotos, 3-butenilo, 4-pentenilo e 2-feniletilo nas raízes. As concentrações de isotiocianatos, quando houve a incorporação da canola e da mostarda no solo, foram mais elevadas até 24 h após, sendo reduzidas para menos de metade em 72 h.

O propenil é encontrado em altas concentrações na parte aérea das três espécies de mostarda (*B. carinata*, *B. nigra* e *B. juncea*) e feniletil é mais comumente encontrado em altas concentrações nas raízes de colza ou cultivares *B. napus* (KIRKEGAARD; SARWAR, 1998).

Em função da volatilidade desses compostos, rápida degradação e ligação ao grupo nucleofílico encontrado em solos orgânicos, sua meia vida é de aproximadamente dois dias no solo a temperatura de 20 °C (MATTHIESSEN; KIRKEGAARD, 2006). O armazenamento de plantas frescas de brássicas em refrigerador comum, com temperatura de 4-8 °C pode provocar uma redução significativa no teor de glucosinolatos com o passar dos dias e, caso o tecido vegetal seja congelado, a perda é ainda maior, pois pode ocorrer o rompimento dos tecidos vegetais e, durante o processo de descongelamento ocorre o contato dos glucosinolatos com a mirosinase, formando isotiocianatos (SONG; THORNALLEY, 2007). Em outra situação, se a brássica for submetida a fervura em água, ocorre a total desnaturação da enzima mirosinase, impedindo a hidrólise dos glucosinolatos e, conseqüentemente, a formação dos isotiocianatos (SHAPIRO et al., 2001).

Os isotiocianatos produzidos pelas *Brassica* spp. foram testados no controle de diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* Schltdl. Nos experimentos foram utilizados compostos químicos puros, predominando sobre o fungo o efeito fungistático, pois os principais isotiocianatos, propenil e etil, inibiram completamente o crescimento micelial e suprimiram a germinação de conídios e clamidósporos de

todos os isolados. Os glucosinolatos também podem liberar os isotiocianatos benzil e fenetil, os quais podem contribuir para o potencial de supressão de conídios e clamidosporos de *F. oxysporum* (SMOLINSKA et al., 2003). Larkin e Griffin (2007) testaram adubos verdes de brássicas no controle de doenças na cultura da batata, causadas por patógenos habitantes do solo e observaram que, de modo geral, a mostarda-da-índia foi mais eficaz na redução da sarna pulverulenta e sarna comum, enquanto a colza e canola foram mais eficazes na redução de doenças causadas por *Rhizoctonia* sp. A mostarda-da-índia inibiu, *in vitro*, acima de 90% o crescimento da maioria dos patógenos, sendo eles *Rhizoctonia solani* (J.G Kuhn), *Phytophthora erythroseptica* (Pethyb.), *Pythium ultimum* (Trow) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, exceto duas espécies de *Fusarium*, *F. oxysporum* e *F. Sambucinum* (Fuckel), que tiveram inibição abaixo de 80%.

Azaiez et al. (2013), com o objetivo de avaliar organismos contaminantes, como o *Fusarium* spp., presentes em alimentos e também a atividade antifúngica de isotiocianatos, testaram o efeito dos isotiocianatos sobre o fungo *Gibberella moniliformis*, e sobre a fumonisina, uma micotoxina que pode estar presente em diversos grãos e é produzida por espécies de *Fusarium* spp. Todos os isotiocianatos testados, benzil, fenil e alil reduziram a fumonisina em média 84,9% após 24 h de incubação. Além disso, os isotiocianatos inibiram o crescimento micelial de três estirpes de *Fusarium*. Esse resultado sugere que os isotiocianatos podem, possivelmente, serem utilizados como conservantes naturais para alimentos.

O uso de brássicas no controle de *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood reduziu o número de galhas em plantas de tomate cv. Santa Cruz 'Kada' em cerca de 60% quando foi realizada a biofumigação com couve-flor e brócolis e 46% com a mostarda. A biofumigação nada mais é que a decomposição de materiais orgânicos que produzem gases tóxicos com efeito no controle de patógenos veiculados ao solo. A maior redução da multiplicação do nematoide foi obtida quando incorporado ao solo resíduos de brócolis (massa seca), associado com a cobertura do solo com plástico, porém, todos os tratamentos em que foram adicionados resíduos de brássicas ao solo apresentaram redução no número de ovos (NEVES et al., 2007). No trabalho realizado por Guerrero-Diaz et al. (2013), no entanto, a utilização de *B. carinata* na biodesinfestação do solo não reduziu a população de *Meloidogyne incognita* na cultura da pimenta. Barros et al. (2014)

avaliaram o efeito dos compostos voláteis de planta de mostarda incorporado ao solo, no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e verificaram que houve redução no número de galhas nas raízes e na reprodução do nematoide. Dentre os compostos orgânicos voláteis encontrados na mostarda estão os álcoois e isotiocianatos, sendo que os compostos tóxicos aos nematoides podem ser retidos em água, evitando que os orgânicos voláteis sejam perdidos para o ar e permitindo que a água se torne tóxica para os nematoides.

O controle de *Pythium abappressorium* foi comprovado com a utilização de farinha de sementes de *B. juncea* aplicada no solo como biofumigante. Além do controle do patógeno, ocorreu também o da doença, mesmo após o término de emissão dos isotiocianatos, por meio da supressão de determinados agentes patogênicos e a proliferação de *Trichoderma* spp., que é um agente benéfico, atuando no controle da doença (WEERAKOON et al., 2012).

A utilização de brássicas no controle de doenças de parte aérea ainda tem sido pouco estudada, mas trabalhos recentes já mostram o efeito positivo dessas plantas contra alguns patógenos. Piva (2013) testou o extrato de pó de canola no controle de oídio (*P. fuliginea*) em pepineiro, em cultivo protegido e verificou que a forma de extração, assim como a concentração, tem influência na eficiência do extrato sobre o controle do patógeno. Nesse trabalho, a melhor forma de extração foi por maceração na concentração de 12%, com redução acima de 50% e 90% na incidência e severidade do oídio, respectivamente. Também ocorreu maior atividade da FAL e maior acúmulo de fenóis totais. Heck (2012) também utilizou o extrato de pó de canola, em aplicação foliar, para controlar o oídio do pepineiro em casa de vegetação e observou que o aumento na concentração do extrato promoveu redução na severidade e incidência do oídio e aumento nos teores de proteínas totais, FAL e fenóis.

### **2.5.3 Indução de resistência em plantas por extratos vegetais**

Os extratos produzidos a partir de algumas plantas possuem compostos secundários que podem ter tanto ação fungitóxica, ou seja, ação antimicrobiana direta ou agir como elicitor, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta) (STANGARLIN et al., 1999).

Quando uma planta hospedeira reconhece um agente patogênico, uma série de respostas pode ser ativada, sendo que algumas contribuem para a ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro contra o patógeno. Uma dessas respostas é a via de transdução de sinal de resistência sistêmica adquirida (RSA), a qual manifesta um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca a necrose e a translocação deste sinal para outras regiões da planta, induzindo reações de defesa (SILVA et al., 2008). Essa via é induzida por elicitores bióticos ou abióticos por meio da exposição do tecido do hospedeiro e tem como principal sinalizador o ácido salicílico, levando ao acúmulo principalmente de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) e fitoalexinas. A RSA pode restringir o crescimento do patógeno suprimindo ou reduzindo os sintomas das doenças. Quando essa via está bloqueada a reação de defesa da planta é comprometida e quando é estimulada por compostos exógenos, a defesa do hospedeiro é fortalecida (RYALS et al., 1996). Outra forma de resposta é a resistência sistêmica induzida (RSI), que ocorre por meio de bactérias promotoras de crescimento, onde o indutor não causa sintomas, mas induz a planta a se proteger sistemicamente. Nesse caso, os principais sinalizadores são o ácido jasmônico e o etileno (SILVA et al., 2008).

A indução dos mecanismos de defesa na planta, disparados por elicitores, inicialmente ativam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), as quais causam danos irreparáveis às membranas celulares. Para reduzir estes danos, a célula ativa mecanismos de detoxificação, com a síntese de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1), que age como um catalisador da dismutação do  $O_2^-$  a  $O_2$  e  $H_2O_2$  (MARCHESE et al., 2008; LEITE et al., 2014).

As enzimas do grupo das peroxidases (POX, E.C.1.11.1.7) fazem parte da composição das plantas, localizadas no apoplasto, e aumentam sua atividade em função do estresse sofrido pela planta, desempenhando um papel importante na proteção da célula vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004; SIEGEL, 1993). As POX estão envolvidas no metabolismo das auxinas e formação de compostos que funcionam como barreiras contra patógenos, como a lignina e a suberina, que reforçam a parede celular. Também participam da reticulação dos componentes da parede celular e síntese de fitoalexinas, que são substâncias tóxicas para determinados



patógenos, além de participarem do metabolismo das EROs, usando  $H_2O_2$  como um substrato (LEITE et al., 2014).

A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL E.C. 4.3.1.5 ) também está relacionada com o sistema de defesa das plantas contra fitopatógenos, atuando na etapa inicial da rota dos fenilpropanóides, transformando a fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, o qual pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), que são precursores de vários compostos, como fitoalexinas, lignina, cumarinas e flavonóides (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Fatores que geram estresse proporcionam aumento da atividade desta enzima, como fatores ambientais e infecção por patógenos.

A síntese de compostos fenólicos ocorre por meio das vias metabólicas do ácido chiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) e constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). O efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e atividade de enzimas microbianas varia entre os diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON, 1995).

O que vai determinar se a planta vai desencadear uma ou mais respostas de defesa é a velocidade com que a mesma reconhece a presença do indutor ou elicitador. Esse reconhecimento ocorre quando moléculas indutoras de defesa em plantas ligam-se a moléculas receptoras que se encontram, normalmente, na membrana plasmática da célula vegetal (BONALDO et al., 2005).

Vechet et al. (2009) compararam a eficiência de várias fontes de indução de resistência ao oídio do trigo, *Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici* Em. Marchal, entre elas os extratos de rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe e *Curcuma longa* L. e de folhas de *Reynoutria sacchaliensis* L. Os autores verificaram que os extratos interromperam o progresso da doença em média até 27 dias após a aplicação. No experimento realizado por Franzener et al., (2003), o extrato aquoso de *Artemisia camphorata*, aplicado na segunda folha verdadeira de plantas de trigo, promoveu a indução de resistência sistêmica, reduzindo o tamanho e o número de lesões (até 60%) causadas por *Bipolaris sorokiniana*, sendo que a maior inibição

ocorreu em plantas tratadas com o extrato 72 h antes da inoculação com o patógeno.

O extrato de folhas de zimmu (*Allium cepa* L. x *Allium sativum* L.) aplicado em frutos de banana contra patógenos que causam podridão da coroa, *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum musae*, apresentaram aumento significativo em fenilalanina amônia-liase (FAL), atividades de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase e maior acúmulo de compostos fenólicos em comparação com outros extratos testados. Estes resultados sugerem que esses compostos podem estar relacionados com a defesa em frutos de banana contra patógenos (SANGEETHA et al., 2013). O extrato de zimmu em associação com *Pseudomonas fluorescens* (Migula) e *Bacillus subtilis* (Cohn) foi eficiente no controle da pinta-preta do tomateiro, causada por *Alternaria solani* (Ellis & G. Martin) L. R. Jones & Grout, tanto no tratamento de sementes como em aplicação foliar. Além disso, o acúmulo das enzimas peroxidase, polifenol oxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase foi maior do que em outros tratamentos.

O estudo revelou que pode ter havido uma resistência sistêmica induzida como reforço da resistência a doenças em plantas de tomate contra a pinta-preta (LATHA et al., 2009). Devaiah et al. (2009) observaram que o extrato aquoso de folhas de *Datura metel*, aplicado no tratamento de sementes, promoveu a indução de resistência em plantas de milho suscetível ao míldio, *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Schroet, demonstrando resistência sistêmica adquirida contra o patógeno, com 67% de proteção em condições de campo. Piva (2013) avaliando o efeito de extratos de pó de canola no controle de oídio comprovou que esses extratos também induziram mecanismos de resistência em plantas de pepino, pois houve aumento da atividade da enzima FAL e compostos fenólicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS**

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Fitopatologia e de Bioquímica e em casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco.

#### **3.2 OBTENÇÃO DOS RESÍDUOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA**

O cultivo da canola (*Brassica napus* L.) foi realizado com a cultivar Hyola 433 e o da mostarda-da-índia (*Brassica juncea* L.), com sementes híbridas da cultivar Q6501. A semeadura foi realizada em junho de 2013, na área experimental da UTFPR – Câmpus Pato Branco. As plantas foram coletadas na fase de pleno florescimento, a qual apresenta grande acúmulo de compostos denominados glucosinolatos, e secadas em estufa a 40 °C, por 72 h. Após, a parte aérea das plantas foi triturada em moinho de facas tipo Willy (SOLAB) peneira 0,25 mm, e armazenada em sacos plásticos escuros, em geladeira a 4 °C, até a utilização.

#### **3.3 PREPARO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA**

Os extratos aquosos à base de pó de canola e mostarda-da-índia foram obtidos pelos métodos de preparo, aquoso simples, macerado, e infusão. Para isto foram utilizadas as quantidades de água destilada de 440 mL para 60 g do pó e todos foram agitados manualmente por 2 minutos.

Para a obtenção do extrato aquoso simples, a água destilada, em temperatura ambiente (~25 °C), foi adicionada em um frasco tipo Becker de 500 mL, sobre o pó de canola ou mostarda-da-índia e, imediatamente após a agitação, foi filtrado em camada dupla de gaze.

Para o extrato aquoso sob infusão, a água destilada foi previamente aquecida até a temperatura de 100 °C e colocada em um frasco tipo Becker de 500 mL de capacidade contendo o pó de canola ou mostarda-da-índia, permanecendo

em repouso por 20 minutos em recipiente fechado. Em seguida, foi realizada a filtração em camada dupla de gaze.

No extrato aquoso obtido por maceração, em um frasco tipo Becker de 500 mL, foi adicionada a água destilada à temperatura ambiente (~25 °C) sobre o pó de canola ou mostarda-da-índia. Após a agitação a mistura ficou em repouso por um período de 8 h, em frasco fechado e temperatura ambiente (~25 °C). Posteriormente, realizou-se a filtração em camada dupla de gaze, separando-se a parte sólida da solução.

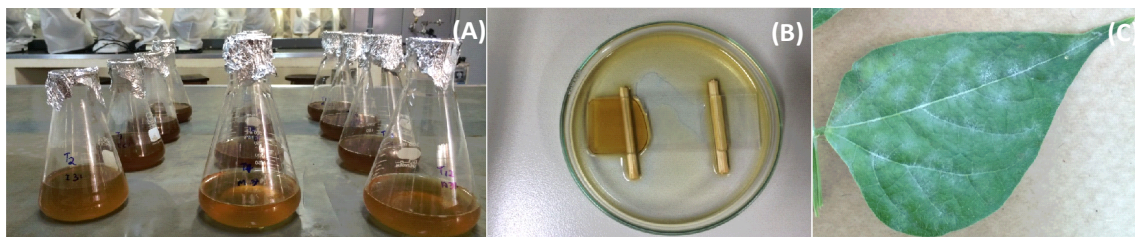
Todos os extratos de canola e mostarda-da-índia obtidos pelos diferentes métodos, corresponderam a uma concentração padrão de 12% e as demais concentrações, 0, 3, 6 e 9%, foram obtidas por meio de diluições da concentração padrão. Os extratos foram aplicados imediatamente após o preparo.

### **3.4 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE A GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE *Erysiphe polygoni***

Para cada extrato, canola ou mostarda-da-índia, foi realizado um experimento utilizando como tratamento os extratos obtidos por meio da infusão, maceração e aquoso simples das respectivas espécies vegetais, nas concentrações de 0, 3, 6, 9 ou 12%, totalizando 15 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 (concentração x métodos de preparo), com quatro repetições por tratamento. Cada experimento foi repetido duas vezes.

O teste de germinação de conídios de *E. polygoni* foi montado utilizando o método das lâminas de vidro adaptado de Silva et al. (2003). Para o preparo dos experimentos, as lâminas de vidro e placas de Petri foram esterilizadas por 20 min em autoclave à 120 °C e 1 atm e secas em estufa a 60 °C, em seguida, cada lâmina foi sobreposta a um suporte, dentro uma placa de Petri, evitando o contato da lâmina com o fundo da placa. Posteriormente foram preparados os extratos de canola e/ou mostarda-da-índia (FIGURA 1 A) e, para cada tratamento, foi adicionado 4 mL de extrato por placa (FIGURA 1 B). Em seguida coletou-se uma folha de feijão-de-vagem de uma planta mantida em casa de vegetação, com alta

esporulação de *E. polygoni* (colônia com 12 dias) (FIGURA 1 C) e, desta folha, foi realizada uma leve raspagem dos conídios do patógeno sobre cada lâmina, aproximadamente 200 conídios por lâmina. Em seguida, as placas foram vedadas com plástico filme e foi efetuada a incubação dos conídios a 23 °C ( $\pm$  1 °C), com exposição à luz por 24 h.



**Figura 01** - (A) Extratos aquosos de mostarda-da-índia preparados pelos métodos: infusão, maceração e aquoso simples e diluídos nas concentrações de 3, 6, 9 e 12%. UTFPR. (B) Lâmina de vidro colocada sobre um suporte, dentro de uma placa de Petri. (C) Folha com esporulação de de *E. polygoni* (colônia de 12 dias). UTFPR, Pato Branco 2014.

Após 24 h de incubação, foi efetuada a contagem aleatória de germinação de 100 conídios por lâmina, no campo microscópico no aumento de 400 x. Foram considerados germinados os conídios com tubo germinativo maior ou igual a sua menor dimensão (FIGURA 2). Juntamente com a germinação, avaliou-se também a porcentagem de apressório formado nos conídios germinados.



**Figura 2** – Conídio de *E. polygoni* com formação do tubo germinativo (1) e apressório lobado (2) (aumento de 400x). UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Depois de obtida a melhor concentração e o melhor método de preparo dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-Índia no controle da germinação de conídios e formação de apressório, foi montado um outro experimento comparativo, com os seguintes tratamentos, testemunha (água destilada), extrato aquoso simples de canola, extrato aquoso simples de mostarda-da-Índia (ambos na concentração de 9%), enxofre inorgânico, leite cru (*in natura*) (10%), fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil e o Bion®. O enxofre inorgânico, o fungicida e o Bion® foram aplicados nas doses de 200 g 100 L<sup>-1</sup>, 4 mL L<sup>-1</sup> e 0,125 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. O delineamento foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos. Esse experimento também foi repetido duas vezes.

### **3.5 USO DE EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA NO CONTROLE DO OÍDIO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Neste estudo foram montados dois experimentos independentes, um avaliando os métodos de preparo infusão, maceração e aquoso simples, nas concentrações de 0, 3, 6 9, ou 12% dos extratos aquosos de canola e outro dos extratos aquosos de mostarda-da-Índia, sendo que ambos foram montados, conduzidos e avaliados igualmente. Os experimentos foram realizados em dois cultivos.

Para a montagem dos experimentos primeiramente foi cultivado, em casa de vegetação, o feijão-de-vagem cultivar macarrão rasteiro baixo de crescimento determinado. A semeadura do feijão-de-vagem foi realizada em vasos de 5 L de capacidade, contendo solo de mata e areia na proporção 3:1 (v:v) (FIGURA 3A e B). Foram semeadas seis sementes por vaso e, 25 dias após a semeadura, efetuou-se o raleio das plantas deixando apenas duas plantas por vaso. A irrigação das plantas foi realizada por meio de fitas gotejadoras.



**Figura 3** – (A) e (B) Germinação e sementeira do feijão-de-vagem cultivar macarrão rasteiro baixo dos experimentos com canola e mostarda-da-índia, respectivamente, no primeiro cultivo. (C) Inóculos de oídio entre os blocos. UTFPR, Pato Branco, 2014.

O delineamento para cada experimento foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 5 x 3 (concentração do extrato x métodos de preparo dos extratos) com cinco repetições por tratamento.

Trinta e cinco dias após a sementeira do feijoeiro realizou-se a inoculação do patógeno agitando uma folha de feijão-de-vagem infectada com *E. polygoni* sobre cada unidade experimental e, a partir de então, foram deixados vasos com inóculo de oídio entre os blocos, sendo realizado o rodízio desses inóculos entre os blocos a cada três dias (FIGURA 3 C).

A primeira aplicação dos respectivos tratamentos foi 24 h antes da inoculação do fungo. A segunda, no início do aparecimento dos sinais do patógeno e as demais aplicações foram semanais, por quatro semanas consecutivas. Os respectivos extratos foram aplicados manualmente por meio de borrifador com bico cônico, até o molhamento total das folhas de feijão-de-vagem.

Para a determinação da intensidade da doença foram realizadas avaliações semanais de incidência e severidade do oídio, com início no surgimento dos primeiros sintomas da doença e, posteriormente, antecedendo-se a cada aplicação dos extratos. Na avaliação da incidência do oídio foram consideradas plantas com os primeiros sintomas da doença. Para avaliar a severidade do oídio foram utilizados dois trifólios do terço médio de cada uma das plantas, totalizando quatro trifólios por vaso. Para quantificação da severidade da doença utilizou-se uma escala diagramática para oídio, adaptada da EMBRAPA (1976) (ANEXO 1), para a estimativa da área foliar infectada.

Após a obtenção dos resultados de incidência e severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por meio da fórmula

descrita por Shaner e Finney (1977):

$$\sum_i^{n-1} \left[ \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \right]$$

em que: n é o número de avaliações,  $y_i$  é a severidade da doença na i-ésima avaliação,  $t_i$  é o tempo na i-ésima avaliação.

Depois de obtido os resultados, outro experimento foi conduzido utilizando-se o melhor método de preparo e a melhor concentração dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia. Esse experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos, testemunha (água), extrato aquoso simples de canola e de mostarda-da-índia, ambos na concentração de 9%, enxofre inorgânico, leite cru (*in natura*) (10%) e o fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil. O enxofre inorgânico e o fungicida foram aplicados nas doses de 200 g 100 L<sup>-1</sup> e 4 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, contendo seis tratamentos.

A condução dos experimentos, assim como as avaliações, foram realizadas da mesma maneira que os experimentos anteriores.

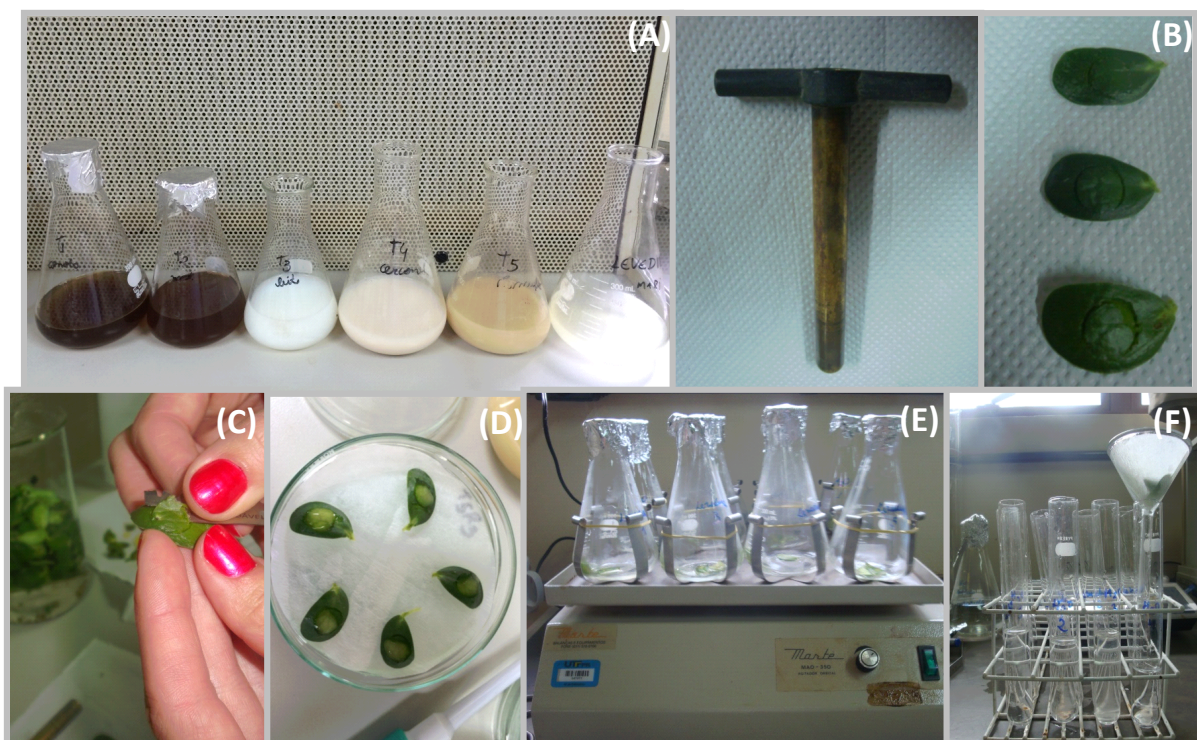
### 3.6 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA

Avaliou-se o acúmulo de fitoalexinas (compostos antimicrobianos) em cotilédones da cultivar de soja NA 5909 rr em resposta a aplicação dos extratos aquosos simples de canola e mostarda-da-índia, na concentração de 9%, leite cru (*in natura*) (10%), enxofre inorgânico (200 g 100 L<sup>-1</sup>), fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil (4 mL L<sup>-1</sup>) e Bion® (0,125 g L<sup>-1</sup>) (FIGURA 4 A).

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos, uma testemunha positiva (extrato de levedura) e uma negativa (água), com quatro repetições. As sementes de soja foram semeadas em copos plásticos de 200 mL contendo substrato autoclavado e mantidas em casa de vegetação. Após 10 dias, os cotilédones foram selecionados e destacados das plântulas, lavados com água destilada e desinfestados por 10 min com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,25% de cloro ativo e lavados novamente com água destilada. Após, os cotilédones foram secos em papel toalha e foi realizada uma



raspagem com uma lâmina esterilizada, em secção aproximada de 1 mm de espessura e 10 mm de diâmetro, com a utilização de um furador manual (FIGURA 4 B e C).



**Figura 4** – Teste de fitoalexinas em cotilédones de soja. (A) Tramentos preparados para a aplicação; (b) cotilédones de soja com uma seccção de 10 mm de diâmetro, feitas com furador manual; (C) raspagem da secção utilizando uma lâmina; (D) cotilédones dentro da placa de Petri, sob papel filtro umedecido; (E) agitação dos cotilédones em frascos erlenmeyers contendo água estéril, para extração da gliceolina; (F) filtragem dos cotilédones para leitura. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Essa metodologia foi escolhida por ser uma metodologia já consolidada, sendo que a semente de soja é utilizada como referência para produção de fitoalexinas.

Cinco cotilédones foram colocados em cada placa de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril (FIGURA 4 D). Posteriormente adicionou-se uma alíquota de 50  $\mu$ L do respectivo tratamento sobre cada cotilédone. Como controle positivo foi preparada solução de leveduras da marca comercial Saf-Instant, com 1 g em 100 mL de água destilada, devidamente autoclavada por 15 min à 120 °C e 1 atm, a solução permaneceu em repouso até esfriar e o sobrenadante foi analisado para seu conteúdo de carboidratos pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956), com glucose como padrão. Após a aplicação dos tratamentos, as

placas de Petri foram mantidas a 26 °C, no escuro, em câmara de crescimento (B.O.D). Depois de 20 h, os cotilédones foram transferidos para Erlenmeyers, nos quais foram adicionado 15 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, os Erlenmeyers foram mantidos em agitação por 1 h para a extração da fitoalexina, então fez-se a filtração em papel filtro qualitativo (FIGURA 4 E e F), sendo o filtrado analisado para a produção de gliceolina em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) em comprimento de onda de 285 nm de acordo com Ayers et al., (1976), Ziegler e Pontzen, (1982), sendo considerados elicitores de síntese de fitoalexinas os tratamentos que apresentaram absorvâncias acima da concentração 0% (água).

### **3.7 ATIVIDADE METABÓLICA EM TECIDOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM TRATADOS COM EXTRATOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA**

Para a avaliação da atividade metabólica em tecidos de feijão-de-vagem foram montados dois experimentos, o primeiro sem inoculação do patógeno e o segundo com inoculação de *E. polygoni* nas plantas, 24 h após a aplicação dos tratamentos. Ambos os experimentos receberam os mesmos tratamentos, sendo eles, testemunha (água), extrato aquoso simples de canola (9%), extrato aquoso simples de mostarda-da-índia (9%), leite cru (*in natura*) (10%) e o Bion® (0,125 g L<sup>-1</sup>).

Para a montagem dos experimentos foram semeadas quatro sementes de feijão-de-vagem da cultivar macarrão rasteiro baixo em copos plásticos de 250 mL, contendo substrato Plantmax® autoclavado. Após a semeadura, os copos foram mantidos em casa de vegetação, dentro de bandejas plásticas. A aplicação dos respectivos tratamentos foi realizada 15 dias após a semeadura do feijão-de-vagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 6 (tratamentos x tempos de coleta das plantas) no primeiro experimento e 6 x 5 (tratamentos x tempos de coleta das plantas) no segundo experimento, sendo uma testemunha inoculada e outra sem inoculação. Os tempos de coleta foram 0, 6, 24, 48, 72 e 96 h e 6, 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente, para o primeiro e segundo experimento, com cinco repetições.

No momento da coleta das plantas, foram cortadas, de cada tratamento, quatro folhas cotiledonares com pecíolo e a primeira folha trifoliolada, sendo rapidamente acondicionadas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio

líquido, posteriormente, armazenadas em ultra freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para as avaliações bioquímicas de proteínas totais, das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidase (POX) e superóxido dismutase (SOD), e compostos fenólicos.

Para a análise de proteínas totais, pesaram-se 0,5 g de tecido foliar para cada amostra que foram maceradas em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5) + PVP (Polivinilpirolidona) e acondicionadas em tubos ependorfe de 2 mL. Em seguida, o material foi centrifugado em 12000 rpm por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , coletando-se o sobrenadante. A quantificação do total de proteínas foi pelo método adaptado de Bradford (1976), que se baseia na interação entre o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Para a análise, transferiu-se 50  $\mu\text{L}$  do extrato sobrenadante para tubos de ensaio, 450  $\mu\text{L}$  de água ultra pura e 1000  $\mu\text{L}$  do corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250. Para a diluição foi adicionado mais 1000 mL de água ultra pura. Posteriormente, os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos. Como padrão foi utilizado a soro de albumina bovina e as leituras de cada amostra foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro, a 595 nm.

A quantificação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues et al. (2006). Foi utilizado 0,5 g de cada amostra vegetal, as quais foram transferidas para almofariz e adicionado 3,0 mL do tampão de extração (TRIS – HCl pH 8,0). Essa mistura foi macerada por aproximadamente um minuto e centrifugada em seguida a 6000 rpm por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foi transferida uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, acrescentando-se 2,5 mL do tampão de extração. A determinação da atividade enzimática da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Para isto, pipetaram-se para tubos de ensaio 750  $\mu\text{L}$  de cada extrato enzimático, acrescentando-se 1000  $\mu\text{L}$  do tampão de extração e 250  $\mu\text{L}$  de fenilalanina ( $49,6\text{ mg mL}^{-1}$ ) ou água destilada na prova em "branco". A mistura foi incubada em banho-maria a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por uma hora, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras espectrofotométricas a 290 nm, em cubeta de quartzo.

Para os compostos fenólicos totais, a quantificação foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como

padrão de referência. O método foi realizado em duas etapas, seguindo o método adaptado de Bielecki e Turner (1966). Na primeira etapa realizou-se a extração dos fenóis totais a partir da adição fracionada de 10 mL de etanol a 80%, sobre o material vegetal. Adicionaram-se inicialmente 5 mL do etanol ao material vegetal, procedeu-se a maceração em almofariz à temperatura ambiente e então foi realizada a centrifugação a 6000 rpm por 5 min e coletado o sobrenadante. Posteriormente o resíduo da centrifugação foi macerado novamente com 5 mL de etanol para uma nova extração, e o sobrenadante coletado foi adicionado ao primeiro. Na quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, adicionando-se em seguida 2,55 mL do reagente Folin-Ciocalteu à 10%. Após 5 min foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio, a 4% e deixado em repouso por 30 min, no escuro, acrescido de 5 min em banho maria à 50 °C, até a leitura da absorbância em 740 nm, em espectrofotômetro. Como controle, utilizou-se água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em  $\text{mg g}^{-1}$  de tecido fresco.

A atividade da enzima peroxidase foi determinada com base na avaliação da variação ( $\Delta$ ) de absorbância proporcionada com oxidação do guaiacol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ ) em presença do peróxido de hidrogênio (DANN; DEVERALL, 2000). Para isso, 0,5 g de material vegetal foi macerado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,01 M e pH 6,0. Posteriormente o extrato bruto foi transferido para tubos ependorfes e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, à 4 °C, retirando o sobrenadante (extrato enzimático). Para a determinação da reação, pipetaram-se para um balão volumétrico, 250  $\mu\text{L}$  de guaiacol (0,02 M) e 306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (0,38 M), completando esse volume para 100 mL com tampão fosfato (0,01 M/pH 6,0). Essa solução foi agitada e transferida para um béquer e deixada em banho maria a 30 °C. Posteriormente, foram adicionados á uma cubeta espectrofotométrica 3 mL desse substrato para enzima (branco) e zerado o espectrofotômetro. Para a leitura das amostras foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  de amostra e 3 mL do substrato para enzima e, imediatamente após colocar a amostra e o substrato foi iniciada a leitura no comprimento de onda de 470 nm, sendo que para cada amostra foram feitas leituras com intervalo de tempo de 15 segundos, durante 2 minutos. A atividade específica de peroxidase foi expressa em ( $\Delta \text{ABS min mg}^{-1} \text{Prot}^{-1}$ ).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada

considerando a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto). Foram macerados 0,5 g de material vegetal em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8. O extrato bruto foi transferido para tubos ependorfes e centrifugado a 10000 rpm por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e utilizado para a análise. Para o preparo da solução de reação, realizada no escuro, foram adicionados 13 mL de metionina (13mM), 15 mg de NBT (0,075 mM), 250 µL de EDTA (1 µM ) e 5 mL de riboflavina (2 µM) em 125 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (50 mM). A reação foi preparada em um volume final de 3,0 mL da solução de reação e 50 µL de extrato vegetal em uma placa de Elisa, exposta a uma câmara com luz fluorescente de 15 watts por 10 min em uma sala escura. Um dos compartimentos foi mantido somente com a solução de reação, observando-se a formação da formazana azul, e nos compartimentos com a adição do extrato vegetal observou-se a inibição da fotorredução do NBT. Após os 10 min, a exposição à luz fluorescente foi interrompida, indicando o final da catálise (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), e a solução foi transferida para uma cubeta de 3,0 mL, realizando a leitura em espectrofotômetro a 560 nm, sendo que antes da leitura o aparelho foi zerando com água. Para cada amostra de reação foi preparado um branco (amostra sem reação), sendo colocado o mesmo volume de extrato vegetal e da solução de reação em outra placa de Elisa, envolvendo esta em papel de alumínio, longe da luz. Após as leituras, foi subtraída a leitura do branco da respectiva amostra de reação, obtendo a leitura final. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância, obedecendo às premissas da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. As médias obtidas com os métodos de preparo dos extratos e as comparações entre os diferentes produtos, quando necessárias, foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro, e as concentrações dos extratos foram submetidas análise de regressão, pelo programa Assistat, versão 7.7 beta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTE NOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA NA GERMINAÇÃO E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO DE *Erysiphe polygoni*

#### 4.1.1 Extratos aquosos de canola na germinação de conídios e formação de apressório de *E. Polygoni*

No teste de germinação de conídios houve diferença significativa em função das concentrações e dos métodos de preparo dos extratos de canola, e ocorreu interação entre as variáveis concentração (C) x métodos de preparo (MP) no Experimento I. Na avaliação de formação de apressório também ocorreu interação significativa entre C x MP. O experimento II não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 1).

**Tabela 1** – Análise de variância para germinação de conídios (%) e formação de apressório (%) em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de canola. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		Experimento I		Experimento II	
		Germinação (%)	Formação de apressório (%)	Germinação (%)	Formação de apressório (%)
Concentração (C)	4	2037,941667**	3065,106861**	6069,270406**	10589,39452**
Métodos de preparo (MP)	2	207,516667**	2164,209682 <sup>ns</sup>	501,261495**	1105,174447**
C x MP	8	240,454167**	691,446111**	228,332122**	1137,399372**
Resíduo	45	7,861111	56,470087	31,733274	40,701991
Coeficiente de variação		16,36%	47,70%	37,89%	30,97%

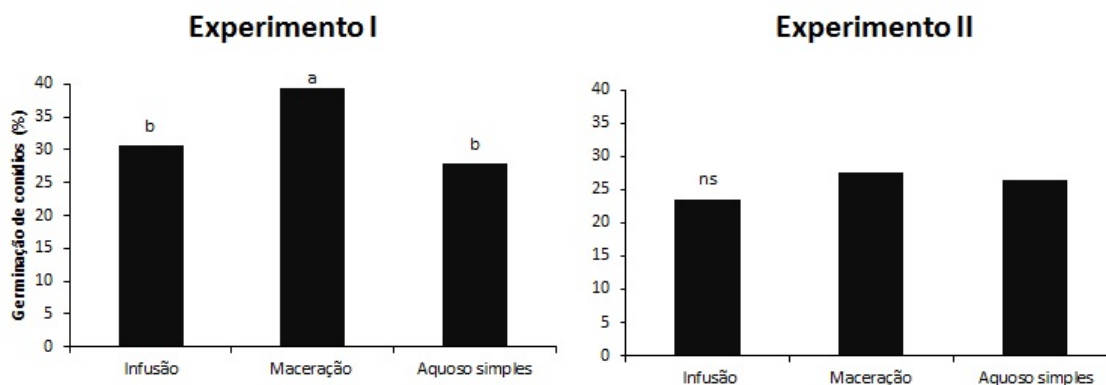
\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro.

\* Significativo a 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo.

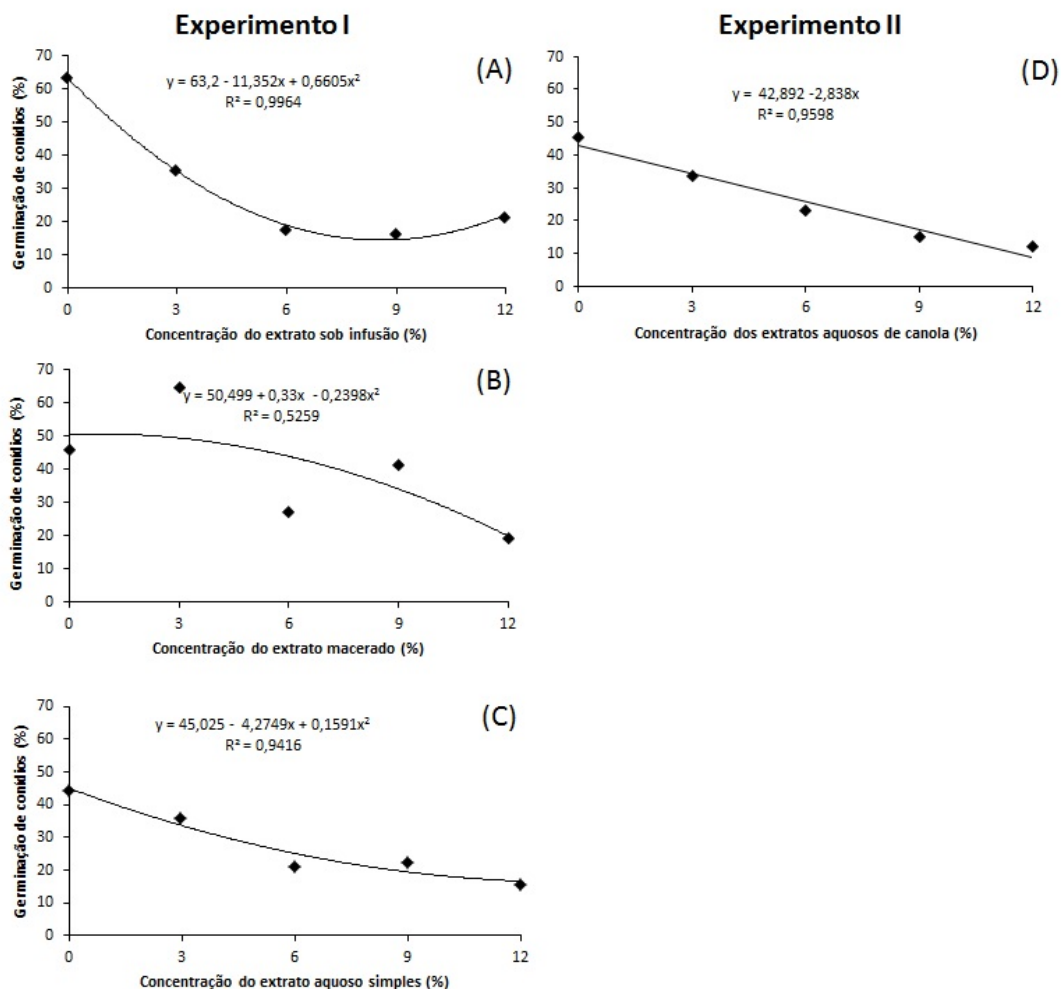
GL = Graus de liberdade

No experimento I, os extratos de canola, preparados pelos métodos de infusão e aquoso simples apresentaram maior inibição da germinação de conídios de *E. polygoni* (FIGURA 5).



**Figura 5** - Métodos de preparo dos extratos aquosos de canola, sobre a germinação de conídios de *E. polygoni*, nos experimentos I e II. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro. Experimento II. Dados transformados em  $\arcsen(\sqrt{x}/100)$ .

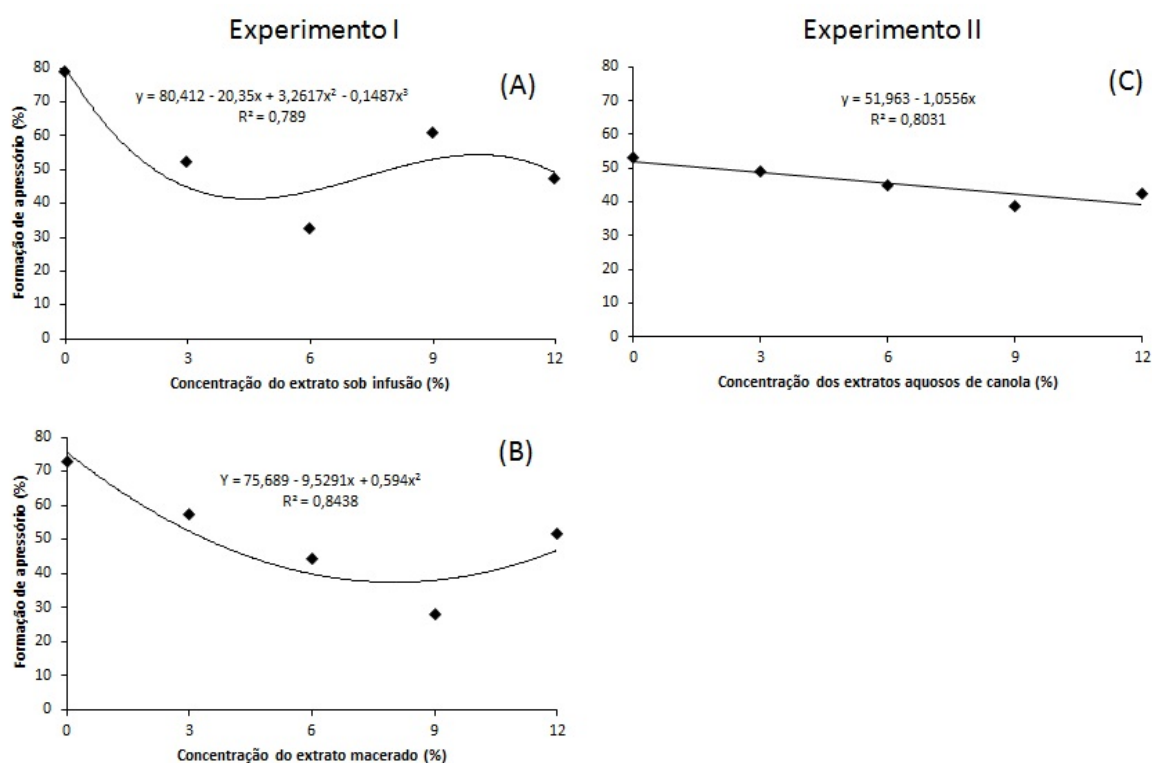
Os métodos de infusão, maceração e aquoso simples apresentaram efeito quadrático para a variável concentração (FIGURA 6 A, B e C). Para os extratos preparados sob infusão e aquoso simples, a redução na germinação de conídios até a concentração de 9%, foi de, aproximadamente, 74 e 50%, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha (concentração de 0%), e com tendência de aumento a partir da concentração de 12% (FIGURA 6 A). No extrato macerado ocorreu um comportamento instável, com tendência de queda na germinação de conídios nas concentrações de 9 e 12% e aumento na concentração de 3%. No experimento II, observou-se efeito linear para todos os métodos de preparo em função da concentração, com redução na germinação de conídios proporcional ao aumento da concentração dos extratos de canola (FIGURA 6 D).



**Figura 6** - Efeito dos extratos aquosos de canola na germinação de conídios de *E. polygoni*, em dois experimentos. (A), (B) e (C) germinação de conídios tratados com extratos preparados sob infusão, maceração e aquoso simples, respectivamente, no experimento I e; (D) germinação de conídios no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. Experimento II. Dados transformados em  $\arcsen(\sqrt{x}/100)$ .

Na avaliação da formação de apressório nos conídios germinados, no experimento I, o extrato obtido por infusão apresentou efeito cúbico, sendo que ocorreu queda na porcentagem de formação de apressório nas concentrações de 6 e 12% (FIGURA 7 A). No tratamento extrato aquoso macerado, houve redução na formação de apressório até a concentração de 9%, com tendência de aumento a partir de 12% (FIGURA 7 B). O experimento II apresentou efeito linear para os métodos de preparo dos extratos em função das concentrações, assim como no teste germinação, com queda na porcentagem de formação de apressório a medida que houve aumento nas concentrações dos extratos (FIGURA 7 C).





**Figura 7** - Efeito dos extratos aquosos de canola na formação de apressório de *E. polygoni*, em dois experimentos. (A) e (B) Concentração dos extratos aquosos obtidos sob infusão e macerado, respectivamente, no experimento I. (C) Concentração dos extratos aquosos de canola no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

O aumento na concentração dos extratos aquosos de canola, de maneira geral, apresentou redução significativa na germinação de conídios e na formação de apressório nos conídios germinados. Esses resultados podem estar relacionados à presença dos glucosinolatos na composição das brássicas, pois, durante a degradação das plantas, esses compostos são hidrolisados pela enzima mirosinase produzindo compostos voláteis fungitóxicos, em especial os isotiocianatos (MORRA; BOREK, 2010; AHUJA et al., 2010).

Contudo, os isotiocianatos, geralmente são testados de maneira isolada e na sua forma química pura, havendo pouca informação na literatura sobre a atividade antifúngica de extratos de brássicas no controle de fungos. Esses extratos podem conter vários isotiocianatos, além de outras substâncias como nitrilas e tiocianatos.

O efeito volátil de alguns isotiocianatos contra fitopatógenos, foi observado em trabalhos como o de biofumigação, *in vitro*, com o alil, o acrilóil, o etil, o benzil e o 1-e 2-feniletil isotiocianatos sobre juvenis (J2) de *M. javanica*, após exposição por 72 h a baixas concentrações ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), porém, a pesar de todos os

isotiocianatos testados terem apresentado atividade nematicida, a eficiência dos mesmos foi variável. Os ITCs alil e etil apresentaram eficiente ação fungistática sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum* e suprimindo totalmente a germinação de conídios e clamidósporos (SMOLINSKA et al., 2003).

Com base nos trabalhos com ITCs e considerando que os conídios avaliados nesse estudo estavam viáveis e perteciam a colônias novas com, aproximadamente, 12 dias, e as condições de incubação, temperatura e luminosidade, eram favoráveis à sua germinação, sugere-se que os extratos de canola adicionados nas placas de Petri liberaram compostos voláteis que atuaram na inibição da germinação dos conídios de *E. polygoni*.

#### 4.1.2 Extratos aquosos de mostarda-da-índia na germinação e formação de apressório de *E. Polygoni*

Os dois experimentos apresentaram diferença significativa para germinação de conídios de *E. polygoni* em função dos métodos de preparo dos extratos de mostarda-da-índia, assim como interação entre C x MP. Também ocorreu interação significativa C x MP, na avaliação de formação de apressório nos experimentos I e II (TABELA 2).

**Tabela 2** – Análise de variância para germinação de conídios (%) e formação de apressório (%) em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de mostarda-da-índia. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		Experimento I		Experimento II	
		Germinação (%)	Formação de apressório (%)	Germinação (%)	Formação de apressório (%)
Concentração (C)	4	2037,941667**	3065,106861**	6069,270406**	10589,39452**
Métodos de preparo (MP)	2	207,516667**	2164,209682 <sup>ns</sup>	501,261495**	1105,174447**
C x MP	8	240,454167**	691,446111**	228,332122**	1137,399372**
Resíduo	45	7,861111	56,470087	31,733274	40,701991
Coeficiente de variação		16,36%	47,70%	37,89%	30,97%

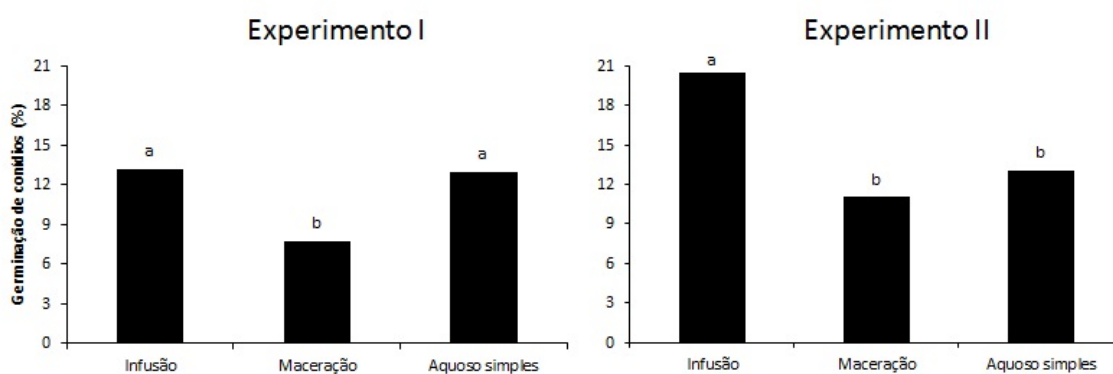
\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo.

GL = Graus de liberdade

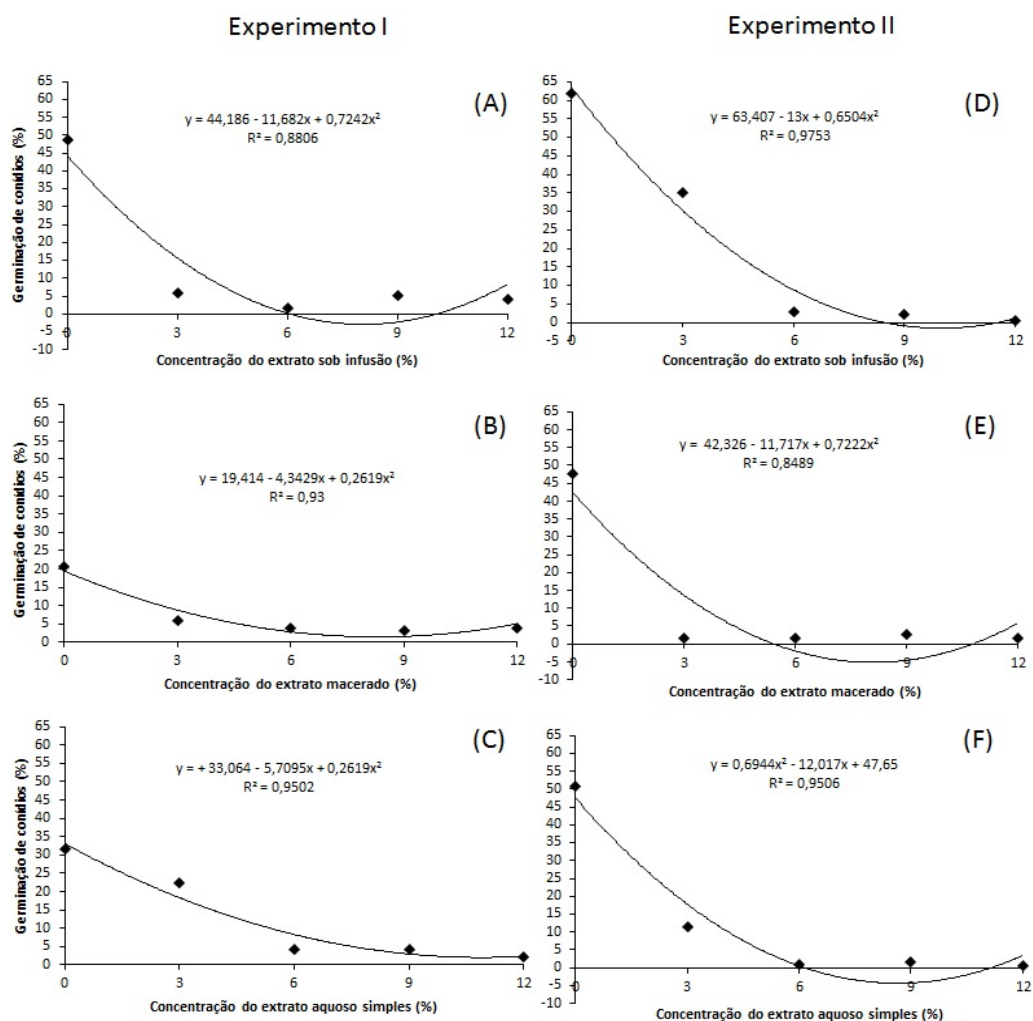
O extrato aquoso de mostarda-da-índia, obtido por maceração, foi o método de preparo que se destacou na redução da germinação de conídios nos dois experimentos, além do aquoso simples no experimento II (FIGURA 8). Esse

resultado diferiu parcialmente dos experimentos com canola, nos quais os melhores métodos de preparo dos extratos para redução da germinação foram o aquoso simples e a infusão. Todos os métodos de preparo dos extratos de mostarda-da-índia, em ambos os Experimentos, I e II, apresentaram efeito quadrático. O extrato obtido por infusão, no Experimento I, reduziu a germinação de conídios de *E. polygoni* até a concentração de 6%, posteriormente teve uma tendência de aumento na porcentagem de germinação (FIGURA 9 A). No Experimento II ocorreu redução na germinação entre a concentração de 0 até 6%, nas concentrações seguintes a porcentagem de germinação se manteve igual a concentração de 6% (FIGURA 9 D, E e F). Nos dois experimentos, os tratamentos extrato aquoso simples e infusão apresentaram comportamento semelhante para a germinação de conídios (FIGURA 9 A, C, D e F). Já, o método macerado, no Experimento I, reduziu a porcentagem de germinação de conídios a partir da concentração de 3%, sendo que nas concentrações seguintes a porcentagem de germinação foi acima de 75%, quando comparada com a concentração de 0% (FIGURA 9 B). No experimento II a redução da germinação de conídios foi de 100%, a partir da concentração de 3% (FIGURA 9 E).



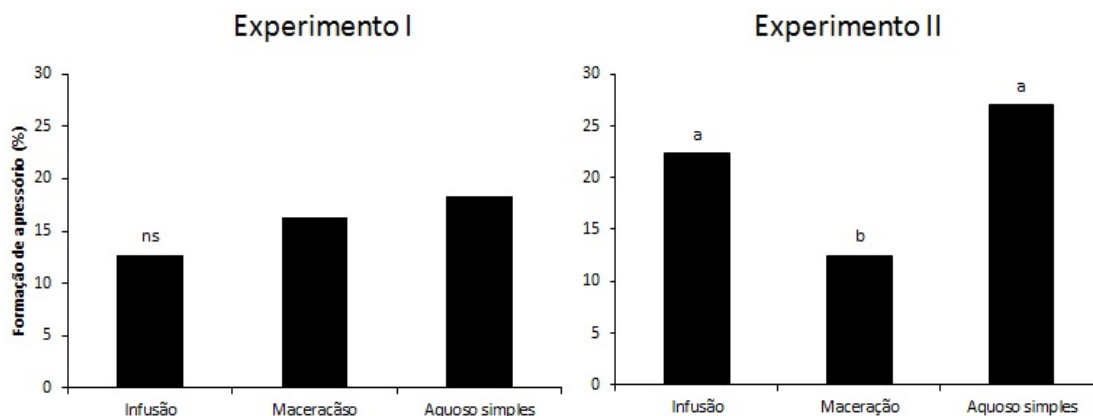
**Figura 8** - Métodos de preparo dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, nos experimentos I e II, sobre a germinação de conídios de *E. polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



**Figura 9** - Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na germinação de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. (A), (B) e (C) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento I. (D), (E) e (F) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

No Experimento II o extrato aquoso macerado de mostarda-da-índia foi o que mais inibiu a formação de apressório de *E. polygoni*, comparado com os outros dois métodos de preparo dos extratos (FIGURA 10), porém, no Experimento I não houve diferença significativa entre os métodos de preparo dos extratos.

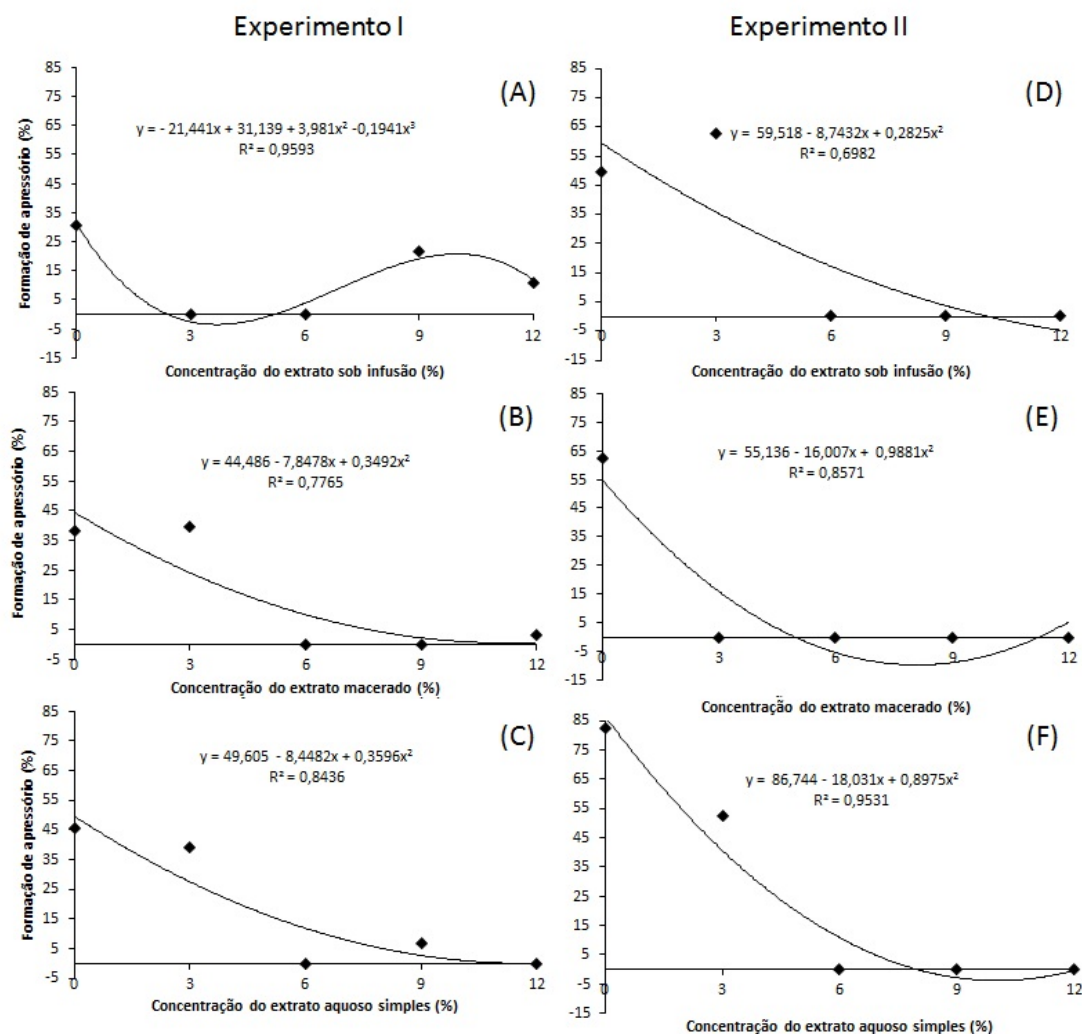


**Figura 10** - Métodos de preparo dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, nos experimentos I e II, sobre a formação de apressório em conídios germinados de *E. polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro.

Experimento I. Dados transformados em  $\arcsen(\sqrt{x}/100)$

A formação de apressório seguiu a mesma tendência da germinação de conídios, porém com maior inibição. No Experimento II, todos os extratos aquosos de mostarda-da-índia, nas concentrações de 6, 9 e 12% inibiram 100% a formação de apressório nos conídios germinados (FIGURA 11 D, E e F). No Experimento I, os extratos obtidos por maceração e aquoso simples, nas concentrações de 6, 9 e 12%, inibiram a formação de apressório nos conídios germinados em mais de 95% (FIGURA 11 B e C). O extrato obtido por infusão inibiu 100% a formação de apressório com as concentrações de 3 e 6 %, tendo seu efeito reduzido a partir da concentração de 9% (FIGURA 11 A).



**Figura 11** - Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na formação de apressório em conídios germinados de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. (A), (B) e (C) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento I. (D), (E) e (F) Concentração dos extratos aquosos de mostarda-da-índia sob infusão, macerado e aquoso simples, respectivamente, no experimento II. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. Experimento I. Dados transformados em  $\arcsen(\sqrt{x}/100)$

A presença de compostos voláteis em *B. juncea* foi comprovada por Barros et al. (2014), obtendo-se 96% de imobilidade de juvenis (J2) de *Meloidogyne incognita* quando a quaba dos tecidos da planta foi a seco e 39% quando foi em água. Porém, quando os tecidos das folhas trituradas a seco foram expostos a água, aumentou a toxicidade dessa brássica a este fitopatógeno. A maioria dos compostos voláteis foi encontrada nos dois tipos de quebra de tecidos (a seco e em água), mas é possível que a água retenha algum composto durante esse processo. Os compostos encontrados nos fragmentos de tecidos da mostarda foram sulfurados, principalmente os isotiocianatos, e álcoois.

O extrato aquoso obtido por maceração demonstrou, nesse estudo, ser mais eficiente que os demais na inibição da germinação de conídios, seguido do extrato aquoso simples. A diferença entre as formas de extrações dos extratos das plantas no controle do oídio pode estar associada a diferente composição de cada extrato, pois cada brássica pode formar diferentes tipos e quantidades de ITCs dependendo das condições de hidrólise e composição química da planta (WILSON et al., 2011).

Além do mais, na extração por maceração, o tempo de contato entre a água e o pó de mostarda-da-índia é muito maior do que nas extrações por infusão e simples, proporcionando maior chance de reação dos glucosinolatos com a enzima mirosinase. Por outro lado, a extração simples apresenta menor chance de perda de compostos voláteis, por que é preparada no momento da sua utilização. De acordo com Ugolini et al. (2014), os ITCs são compostos voláteis e, portanto, diferentes quantidades destas substâncias podem ser perdidas durante as diferentes formas de preparo dos extratos.

Angus et al. (1994), verificaram, em testes *in vitro*, que o fungo *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx e Oliver, agente causal do mal-do-pé em trigo, foi inibido pela presença de raízes secas de canola e mostarda-da-índia e que a maior inibição ocorreu quando as brássicas foram adicionadas no momento ou imediatamente após a inoculação do patógeno. O autor ainda observou que essa inibição era causada por compostos voláteis, pois a simetria do crescimento do patógeno não foi afetada, mesmo próxima do tecido das brássicas no meio BDA. Os principais compostos encontrados nesses tecidos foram os isotiocianatos, principalmente o metil, em canola e o feniletil, em mostarda-da-índia.

Bactérias presentes em alimentos foram inibidas, de maneira eficiente, pelo extrato aquoso de *B. juncea* e, com menor eficiência, pelo extrato aquoso de *Borago officinalis*. Entretanto, durante o armazenamento prolongado, o potencial inibitório dos extratos foi sendo reduzido. Apesar disso, a utilização dessas plantas não deixa de ser uma alternativa eficiente para o controle de bactérias em produtos armazenados por um curto período de tempo. Os autores relataram ainda que a concentração dos extratos que foi mais eficiente nos testes *in situ* (100 mg mL<sup>-1</sup>) foi 10 vezes superior à concentração testada *in vitro* (MICELI et al., 2014).

Os resultados obtidos por Lage (2009), também demonstram que os isotiocianatos produzidos pelas brássicas apresentam efeito sobre a germinação de conídios. A fumigação com óleo essencial de mostarda, contendo 90% do isotiocianato alil, *in vitro*, não alterou a formação de conídios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, porém afetou a germinação de conídios e clamidósporos, principalmente quando aumentou o período de exposição de 24 para 48 h. Os conídios de *E. polygoni*, permaneceram por um período de 24 h expostos aos extratos de mostarda-da-índia e, mesmo assim os extratos foram eficientes. Talvez, se a exposição fosse maior, a concentração de 3% poderia ter alcançado a mesma eficácia das demais.

O trabalho desenvolvido por Koenraad et al. (2001) deixa claro a eficiência dos extratos aquosos na extração de isotiocianatos em brássicas, pois foram testados quatro solventes, sendo eles água, metanol, etanol e acetina, no preparo de extratos de folhas de *Arabidopsis*, que pertence a família das brássicas, para avaliar os compostos antimicrobianos pré-formados nessa planta. Após a evaporação dos solventes, os resíduos dos extratos testados apresentaram níveis mais elevados de atividade antimicrobiana quando utilizaram a água como solvente. Desses compostos, os mais abundantes na planta foram os isotiocianatos, e estes apresentaram ação inibitória, *in vitro*, a uma gama de fungos e bactérias, como *Alternaria brassicicola*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Peronospora parasitica*, ou as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae*.

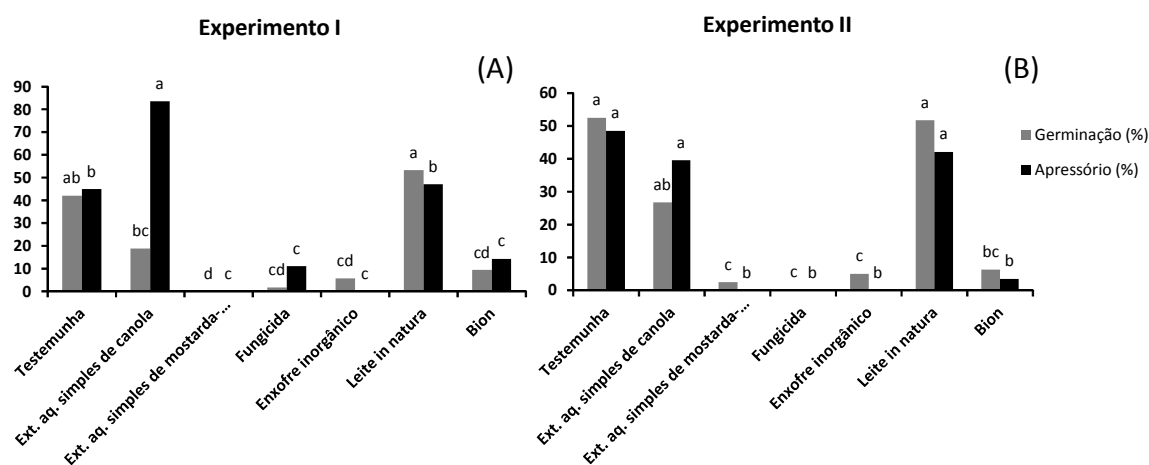
#### **4.1.3 Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia com o fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico, leite cru (*in natura*) e o Bion®, na germinação e formação de apressório de *E. Polygoni***

O extrato de canola e mostarda-da-índia, utilizado nesse teste, foi obtido pelo método aquoso simples, na concentração de 9%, considerando que este é um método simples e foi eficiente na redução da germinação de conídios e formação de apressório.

Os dois experimentos apresentaram efeito significativo entre os tratamentos ( $P \leq 0,01$ ), tanto para germinação de conídios (%) quanto para formação de apressório (%).



O extrato aquoso simples de mostarda-da-índia, assim como o fungicida, o enxofre inorgânico e o Bion® foram os que mais inibiram a germinação dos conídios em ambos os experimentos (FIGURA 12 A e B), por outro lado, o extrato aquoso simples de canola e o leite cru não diferiram significativamente da testemunha. O extrato de mostarda-da-índia inibiu 100% a germinação, o fungicida, o enxofre inorgânico e Bion® inibiram 96, 86 e 78%, respectivamente no experimento I (FIGURA 12 A), e os mesmos tratamentos inibiram a germinação em mais de 90% no experimento II (FIGURA 12 B), exceto o Bion® que inibiu 87%. O leite cru não teve efeito algum de compostos voláteis sobre a germinação de conídios de *E. Polygoni*, porém pode apresentar efeito germicida contra o oídio, mas por meio da aplicação direta (BETTIOL, 2004). O extrato aquoso simples de canola, a pesar de não diferir significativamente da testemunha no teste de germinação, apresentou efeito semelhante ao fungicida, ao enxofre inorgânico e ao Bion® no experimento I (FIGURA 12 A).



**Figura 12** - Efeito dos extratos aquosos simples de canola e mostarda-da-índia, na concentração de 9%, comparados com fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico, leite cru (*in natura*) e o Bion®, na germinação e formação de apressório de *E. polygoni*, realizado em dois experimentos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro. Os dados de germinação foram transformados para  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$

O extrato de canola, apesar de não diferir estatisticamente do tratamento testemunha, possui compostos voláteis, assim como a mostarda-da-índia, que são tóxicos à patógenos. Essa diferença entre o efeito dos dois extratos, nesse teste, pode ter ocorrido por fatores ligados ao preparo do extrato ou mesmo

por alguma alteração no pó da canola, pois, no teste anterior, as concentrações de 6, 9 e 12% apresentaram resultados satisfatórios, com porcentagem média de 45% de inibição da germinação. Entretanto, pode haver diferença na composição das plantas, sendo que o tipo e a quantidade de compostos voláteis pode variar de uma espécie para outra (WILSON et al., 2011). A mostarda-da-índia novamente mostrou-se eficiente no controle da germinação de conídios e formação de apressório de *E. polygoni*, se igualando ao fungicida comercial.

García et al. (2011) testaram diferentes ITCs e observaram que houve diferença na eficiência desses na inibição da germinação, *in vitro*, de isolados de *F. oxysporum*. Além disso, o efeito foi diferente para cada isolado e, quando os isotiocianatos foram retirados das placas de Petri, os fungos retomaram seu crescimento e germinação.

O fungicida, mesmo tendo demonstrado ação sobre a germinação de conídios e formação de apressório no oídio do feijão-de-vagem, no teste *in vitro*, não possui relatos de que o tiofanato-metílico ou o clorotalonil apresentem efeito de gases. O tiofanato-metílico pertencente ao grupo químico dos benzimidazois e esse grupo apresenta ação direta em fungos. O clorotalonil também possui ação direta sobre os fungos e pertence ao grupo dos fungicidas protetores (ADAPAR, 2016).

O enxofre inorgânico também pertence aos fungicidas protetores e possui efeito desalojante, por meio da liberação de gases sulfídricos (BASF, 2016), atuando nas mitocôndrias presentes nas células, afetando o processo de formação energia em forma de ATP (adenosina trifosfato).

O Bion®, por outro lado, é um ativador de plantas, não apresentando ação direta contra patógenos e sim agindo no metabolismo secundário das plantas e também sem relatos de efeito de compostos voláteis.

Os resultados do teste de formação de apressório são semelhantes aos resultados do teste de germinação, em ambos os experimentos.

## **4.2 USO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA SOBRE O OÍDIO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

### **4.2.1 Extratos aquosos de canola**

No primeiro cultivo não houve diferença significativa entre os métodos de preparo dos extratos de canola na avaliação da AACPD da incidência e da severidade do oídio (TABELA 3). O segundo cultivo apresentou diferença significativa entre os métodos de preparo dos extratos de canola apenas na AACPD da severidade, e não ocorreu interação entre os tratamentos (TABELA 3).

**Tabela 3.** Análise de variância para a AACPD da incidência e da severidade de *Erysiphe polygoni*, em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de canola, em dois cultivos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		Primeiro cultivo		Segundo cultivo	
		Incidência	Severidade	Incidência	Severidade
AACPD					
Concentração (C)	4	1553533,333**	210858,6131**	297416,6667**	180393,5519**
Métodos de preparo (MP)	2	647500,0000 <sup>ns</sup>	5231,04584 <sup>ns</sup>	150533,3333 <sup>ns</sup>	21046,69906**
C x MP	8	774083,3333 <sup>ns</sup>	4922,30809 <sup>ns</sup>	72116,6667 <sup>ns</sup>	4031,34076 <sup>ns</sup>
Tratamentos	14	978700,0000*	63805,35776**	147690,47619**	56851,30940**
Blocos	4	2522200,0000**	56942,81724**	25833,3333 <sup>ns</sup>	11023,42133*
Resíduo	56	458378,5714	11535,08536	56529,7619	3739,71592
Coeficiente de variação		26,79%	44,94%	12,69%	8,58%

\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro.

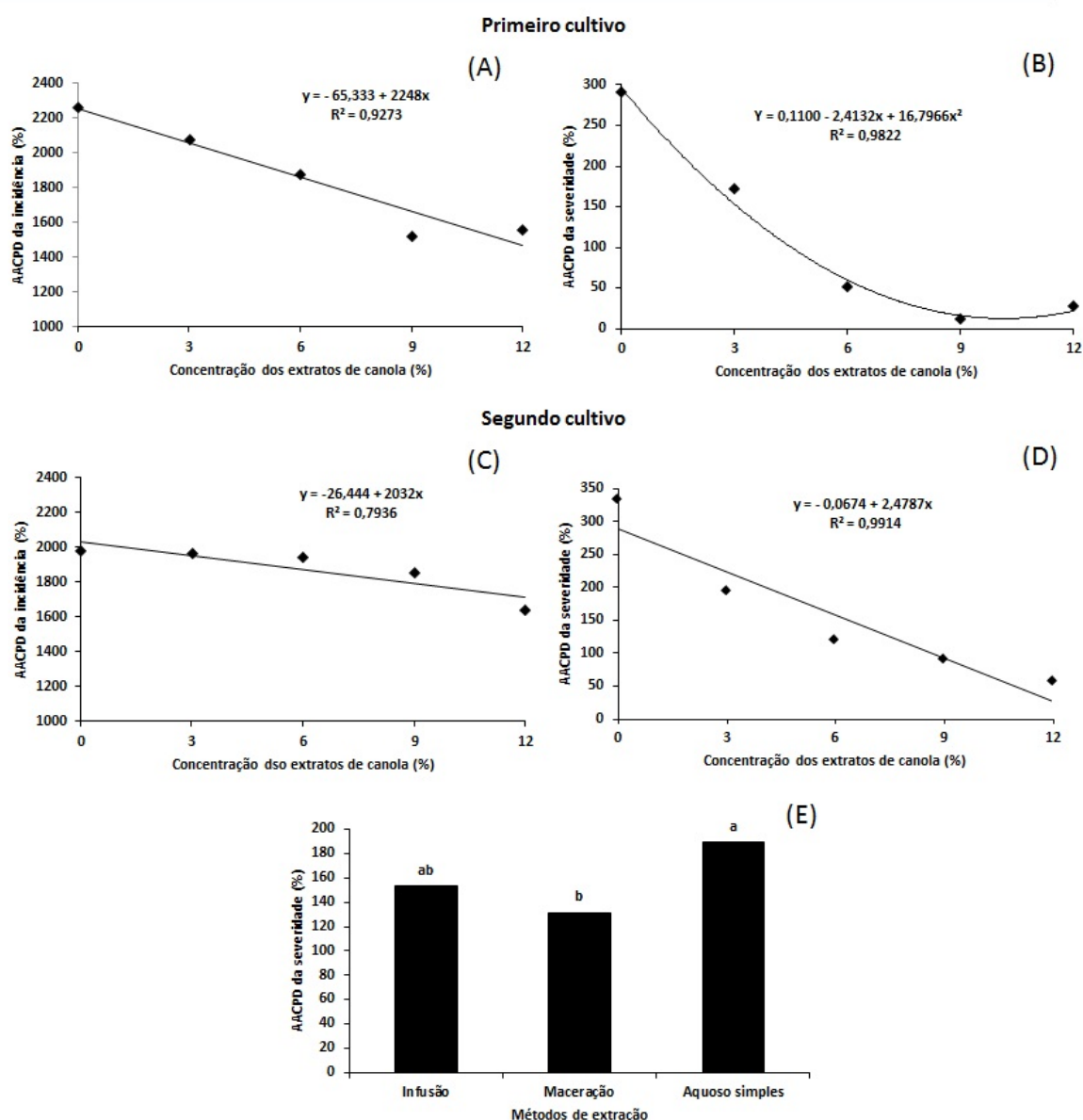
\* Significativo a 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo.

GL = Graus de liberdade

Nos dois cultivos houve efeito linear na avaliação da AACPD da incidência de oídio nas plantas de feijão-de-vagem. O aumento na concentração do extrato foi inversamente proporcional ao aumento da AACPD da incidência (FIGURA 13 A e C). As concentrações de 9 e 12% reduziram, aproximadamente, 30% a AACPD da incidência em relação a concentração de 0%, no primeiro cultivo e 6 e 17%, no segundo cultivo.

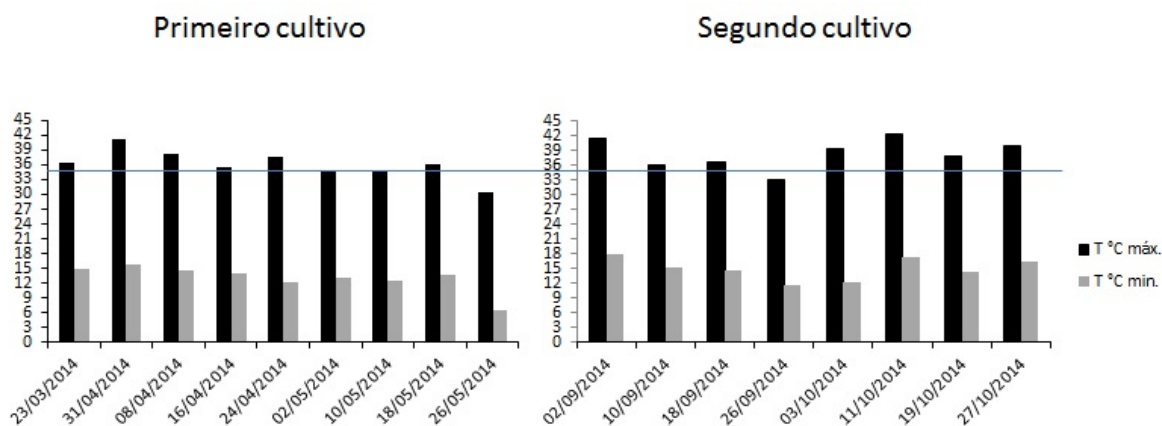
Na avaliação da AACPD da severidade do oídio, ocorreu efeito quadrático no primeiro cultivo, com maior redução da severidade do oídio na concentração de 9%, com tendência de aumento da severidade a partir da concentração de 12% (FIGURA 13 B). No segundo cultivo houve efeito linear, sendo que o aumento na concentração do extrato foi inversamente proporcional ao aumento da AACPD (FIGURA 13 D). As concentrações de 9 e 12% reduziram 96 e 90%, respectivamente, a AACPD no primeiro cultivo e 73 e 83% no segundo cultivo.



**Figura 13** - Efeito das concentrações dos extratos aquosos de canola na AACPD da incidência (A) e (C) e da severidade (B) e (D) de *E. polygona*, no primeiro e segundo cultivo do feijão-de-vagem, e efeito dos métodos de preparo dos extratos aquosos de canola na AACPD da severidade (E) de *E. polygona*, no segundo cultivo, em casa de vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro. Dados de severidade foram transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

A pesar do comportamento semelhante nos dois cultivos, as médias da temperatura máxima, durante o primeiro cultivo ficaram abaixo das médias do segundo cultivo, principalmente nos quatro últimos decêndios (FIGURA 14), período em que ocorreu maior pressão de inóculo. No segundo cultivo a maioria das médias passaram de 35 °C. As temperaturas acima de 35 °C, mesmo sendo

desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, permitem que os compostos voláteis presentes nos extratos volatilizem mais rapidamente e sejam perdidos para o meio externo, principalmente por estarem em um ambiente sem isolamento, com é o caso da casa de vegetação.



**Figura 14** – Médias de dados deciduais de temperaturas máxima e mínima, no primeiro e segundo cultivo, em casa-de-vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Neste estudo, embora não tenham sido determinadas quais substâncias químicas estavam presentes nos extratos da canola, o alto nível de controle do oídio no feijão-de-vagem, principalmente nas maiores concentrações do extrato, pode ser devido aos compostos voláteis liberados por essa planta, os ITCs, conforme foi verificado nos testes de germinação de conídios. Como as plantas de canola foram coletadas na fase de florescimento, pode ser que houve maior acúmulo de glucosinolatos nas folhas e nas flores, pois segundo o relato de Bellostas et al. (2004), o teor de glucosinolatos, precursor dos isotiocianatos, encontrados em diferentes espécies de brássicas, foi mais elevado nos órgãos reprodutivos (flores), em comparação com as outras partes vegetativas. Além disso, o acúmulo de glucosinolatos é maior em folhas mais jovens do que as folhas mais velhas (PORTER et al., 1991). Como nesses experimentos foi realizada a aplicação direta dos extratos nas plantas, outros modos de ação podem estar agindo, como a indução de resistência das plantas ao patógeno, considerando que existem compostos que atuam como elicitores.

No segundo cultivo, a maceração se destacou como melhor método de preparo dos extratos, com 30% a mais de controle da AACPD da severidade em

relação ao aquoso simples, mas não diferiu significativamente da infusão.(FIGURA 13 E).

Os glucosinolatos presentes na canola, como citado no teste de germinação, precisam entrar em contato com a enzima mirosinase, por meio de uma reação de hidrólise, para então serem convertido em isotiocianatos. Por isso, a quebra do tecido seco, juntamente com a adição de água para o preparo dos extratos aquosos torna os isotiocianatos disponíveis. Essa água é que vai permitir a liberação desses compostos voláteis. E quanto mais concentrado estiver esse extrato, maior será sua eficiência contra o oídio (MORRA; KIRKEGAARD, 2002).

#### 4.2.2 Extratos de mostarda-da-índia

A AACPD da incidência e da severidade apresentaram diferença significativa em função da concentração, nos dois cultivos, mas não apresentaram diferença significativa em função dos métodos de preparo dos extratos de mostarda-da-índia (TABELA 4).

**Tabela 4** - Análise de variância para a AACPD da incidência e da severidade de *Erysiphe polygoni*, em função da concentração (C) e métodos de preparo (PM) dos extratos aquosos de mostarda-da-índia, em dois cultivos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2014.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		Primeiro cultivo		Segundo cultivo	
		Incidência	Severidade	Incidência	Severidade
AACPD					
Concentração (C)	4	3378416,667**	427124,8704**	222133,3333**	154237,5068**
Métodos de preparo (MP)	2	43233,3333 <sup>ns</sup>	15,898385 <sup>ns</sup>	26133,3333 <sup>ns</sup>	13084,45179 <sup>ns</sup>
C x MP	8	87566,66667 <sup>ns</sup>	4670,690004 <sup>ns</sup>	56758,3333 <sup>ns</sup>	10435,53397 <sup>ns</sup>
Tratamentos	14	1021476,190**	1021476,190**	99633,3333 <sup>ns</sup>	51900,22876**
Blocos	4	1093416,667**	1093416,667**	360966,66666 <sup>ns</sup>	72109,36140**
Resíduo	56	196470,2381	196470,2381	80966,6666	13116,29694
Coeficiente de variação		24,27%	33,75%	10,56%	11,72%

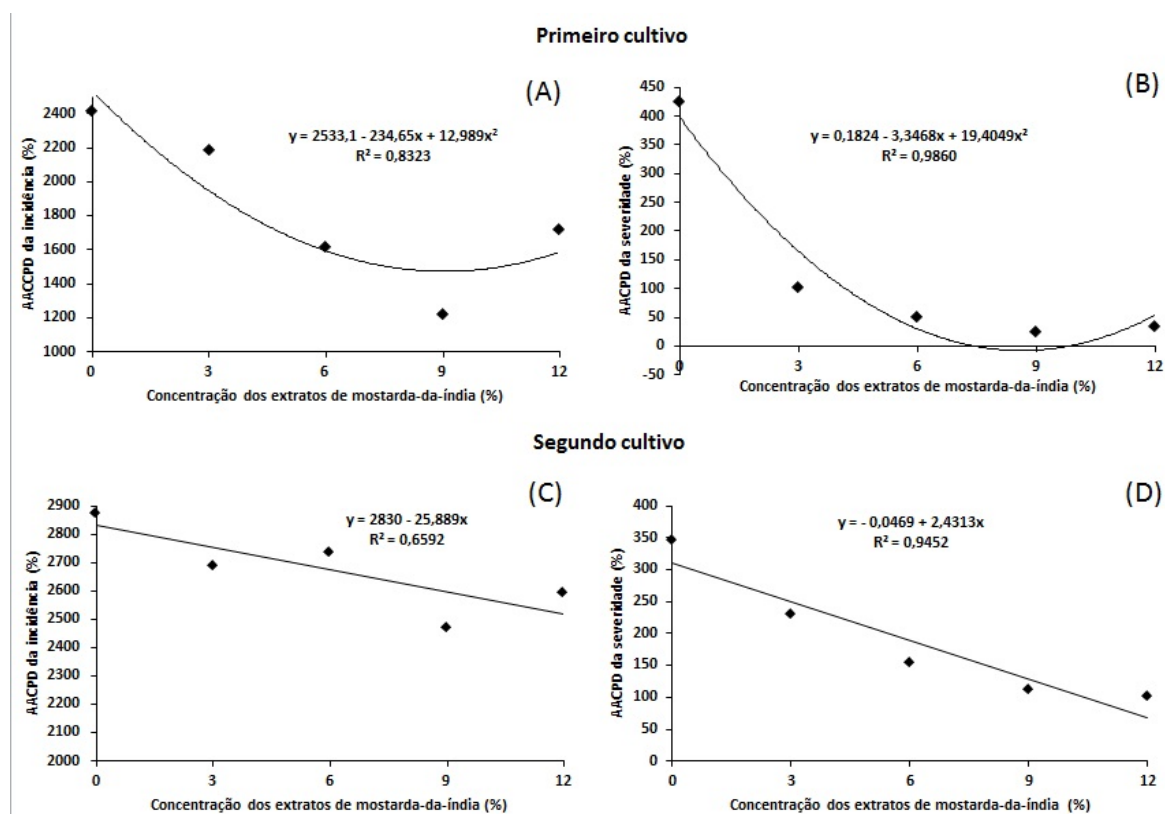
\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro.

NS não significativo.

GL = Graus de liberdade

Na avaliação dos extratos de mostarda-da-índia sobre a AACPD da severidade do oídio, no primeiro e segundo cultivo, as concentrações de 9 e 12%, apresentaram redução da severidade em torno de 70% nos dois cultivos (FIGURA 15 B e D). As mesmas concentrações apresentaram controle de 50 e 29%,

respectivamente, da AACPD da incidência no primeiro cultivo (FIGURA 15 A). No segundo cultivo, a concentração de 9% reduziu 14% a AACPD da incidência (FIGURA 15 C).



**Figura 15** - Efeito dos extratos aquosos de mostarda-da-índia na AACPD da incidência (A) e (C) e da severidade (B) e (D) de *E. polygoni*, em casa de vegetação, no primeiro e segundo cultivo. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. Dados de severidade foram transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$

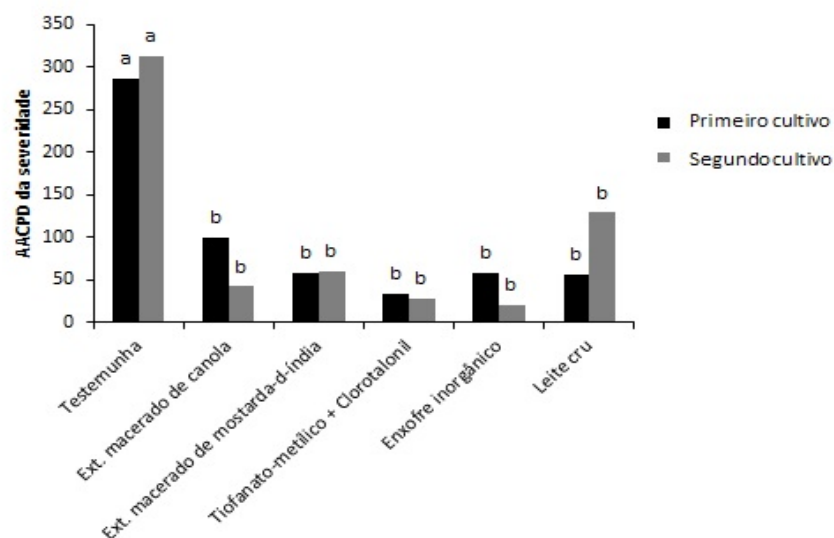
Outros trabalhos comprovam o efeito da mostarda-da-índia sobre patógenos e indicam que o controle ocorre por meio de compostos voláteis. A mostarda-da-índia apresentou ação contra o *P. abapressorium* e outros patógenos veiculados ao solo, atuando como um produto biofumigante e também permitindo a sobrevivência e proliferação de agentes benéficos, como é o caso do *Trichoderma* spp. O efeito biofumigante da *B. juncea* sobre o *P. abapressorium* foi maior quando o solo foi ensacado, porém, tanto no solo ensacado como no não ensacado os resultados foram melhores que para a testemunha (WEERAKOON et al., 2012). A *B. juncea* também reduziu o número de ovos de *M. javanica* em tomateiro, independente da utilização ou não da solarização junto com a fumigação (NEVES et al., 2007).

Tal como no experimento com extratos de canola, o primeiro cultivo apresentou menor AACPD da incidência e da severidade em função da aplicação dos extratos de mostarda-da-índia. Essa resposta também pode estar relacionada à temperatura, que foi maior durante o segundo cultivo, proporcionando maior perda de compostos voláteis.

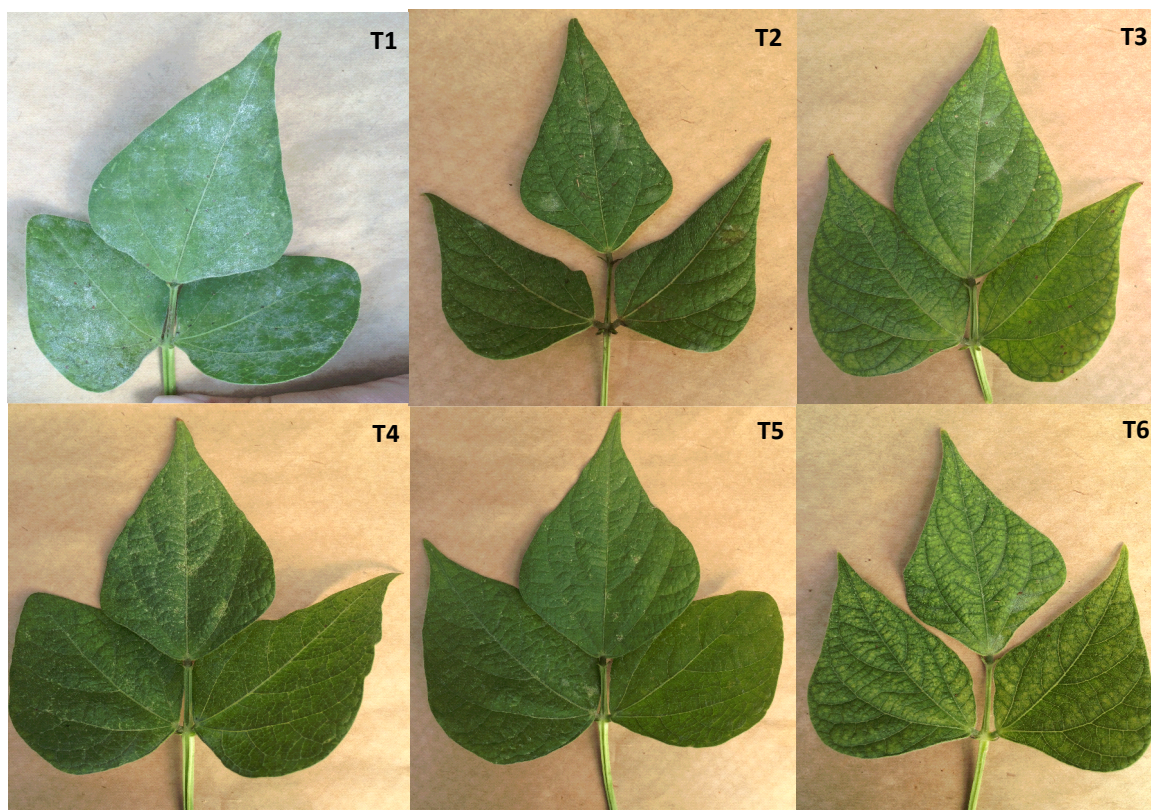
#### **4.2.3 Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia com o fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico e leite cru (*in natura*), em casa de vegetação**

Nesse experimento, todos os tratamentos foram eficientes no controle do oídio em relação ao tratamento testemunha (FIGURA 16). No primeiro cultivo, os extratos de canola e mostarda-da-índia controlaram em 65 e 80%, respectivamente, a severidade do oídio em feijão-de-vagem. Já no segundo cultivo, o controle foi acima de 80% para os mesmos extratos, quando comparados com o tratamento testemunha. O fungicida controlou em 88% (primeiro cultivo) e 91% (segundo cultivo) a severidade do oídio, porém não diferiu estatisticamente dos extratos, do enxofre inorgânico e do leite cru (FIGURA 16). Na Figura 17 é possível observar a diferença entre os tratamentos nas folhas de feijão-de-vagem.





**Figura 16** - Efeito dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, do fungicida tiofanato-metílico + clorotalonil, enxofre inorgânico e leite de vaca *in natura*, na AACPD da severidade e da incidência de *E. polygoni*, em casa de vegetação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Dados de severidade transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$ . CV=29%



**Figura 17** – Folhas de feijão-de-vagem com aplicação dos tratamentos: (T1) testemunha água; (T2) extrato aquoso simples de canola; (T3) extrato aquoso simples de mostarda-da-índia; (T4) Tiofanato-metílico + clorotalonil; (T5) Enxofre inorgânico; (T6) Leite cru. UTFPR, Pato Branco – PR, 2015.

Os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia apresentaram efeito fungitóxico sobre o oídio, em ambos os cultivos. Esse efeito, como citado nos testes anteriores, pode ter ocorrido devido a ação dos isotiocianatos (Koenraad et al., 2001).

Masheva et al. (2014) testaram o efeito de óleos essenciais, dentre eles, o óleo de mostarda branca (*Brassica alba* L.) nas concentrações de 0,5 e 1,0%, contra o oídio em pepino e verificaram que ambas as concentrações foram eficientes no controle do oídio com, aproximadamente, 80% de controle em relação a testemunha, se igualando aos produtos comerciais testados.

O controle químico do oídio em feijão-de-vagem não dispõe de muitos produtos, mas é um método eficiente. Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis, como é o caso do tiofanato-metílico, agem no processo de divisão celular, afetando a mitose e a proteína tubulina, formadora de microtúbulos que compõe o citoesqueleto celular, esses microtubulos é que dão suporte estrutural para a manutenção do formato das células e disposição interna das organelas. Essa ação pode ocorrer durante emissão do tubo germinativo, na hifa de penetração e no crescimento micelial. O clorotalonil faz parte dos fungicidas protetores e age na permeabilidade da membrana celular, alterando os processos metabólicos e provocando o extravasamento do conteúdo celular (RODRIGUES, 2006), sendo considerado um excelente fungicida no controle do oídio (NASIR et al., 2014). McGrath (1996) mostraram em seu trabalho a eficiência do fungicida clorotalonil no controle da severidade do oídio em abóbora, associado ou não com o fungicida triadimefon.

O enxofre inorgânico promove razoável controle do oídio, porém, em temperaturas acima de 30 °C, pode provocar danos nas plantas, como escaldadura de flores e frutos jovens (NASIR et al., 2014).

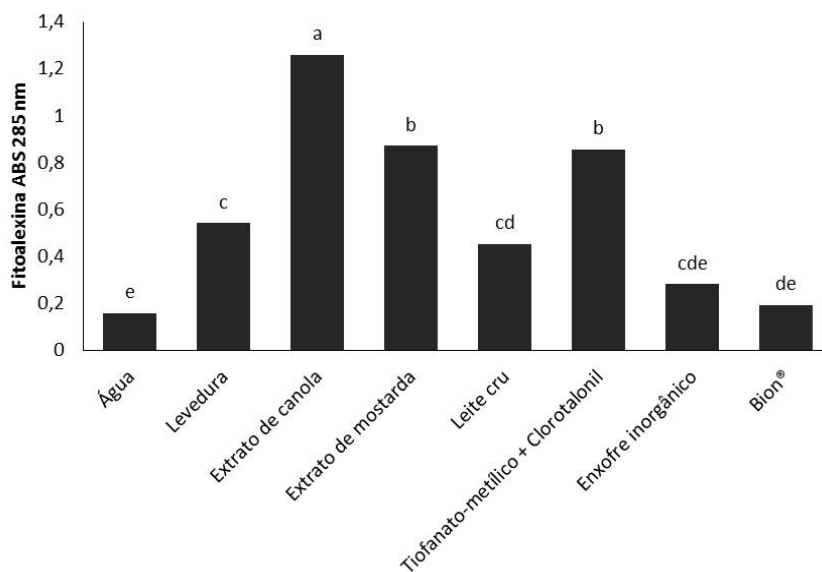
O leite cru (*in natura*), já utilizado no controle de oídios, foi tão eficiente quanto os outros produtos. Todas as fontes de leite têm potencial de controle de oídio e favorecem a sobrevivência de outros fungos e de colônias bacterianas que podem ter potencial no controle do oídio. Porém, a eficiência dessas fontes é reduzida quando o leite passa por tratamento térmico (MEDEIROS et al., 2012).

No experimento realizado por Perina et al. (2013), efetuou-se a aplicação de leite, *in natura*, em plantas de soja e, 24 h depois, as plantas

foram inoculadas com *E. diffusa*. O resultado obtido foi de que ocorreu efeito direto do leite a 10%, com controle de 67% do oídio. O leite, por sua vez, pode apresentar mais de um modo de ação sobre o oídio, sendo que o leite fresco ou *in natura* pode ter efeito direto devido às suas propriedades germicidas; pode induzir a resistência das plantas e/ou controlar diretamente o patógeno, devido à presença de sais e aminoácidos; pode ainda estimular o controle biológico natural, formando um filme microbiano na superfície foliar ou alterar as características físicas, químicas e biológicas da superfície foliar (BETTIOL, 2004).

#### **4.3 PRODUÇÃO DE FITOALEXINAS EM COTILÉDONES DE SOJA**

Para verificar o potencial de indução de fitoalexinas foi realizado o teste em cotilédones de soja, que resultou na maior indução da gliceolina pela aplicação do extrato aquoso simples de canola, seguido do extrato aquoso simples de mostarda-da-índia e do fungicida tiofanato-metílico + Clorotalonil (FIGURA 18). Esses três tratamentos exibiram médias superiores à testemunha positiva (levedura). Os extratos de canola e mostarda-da-índia apresentaram aumento de 87% e 82%, respectivamente, na síntese de fitoalexinas, em relação à testemunha negativa (água). Além desses, o leite cru também foi superior a testemunha negativa.



**Figura 18** - Indução de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja. UTFPR, Pato Branco - PR, 2015. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV=21,44%

A maioria das fitoalexinas produzidas pelas leguminosas pertence a classe de isoflavonoides, como a dos pterocarpanos, na qual se encontram as fitoalexinas pisatina, gliceolina e a faseolidina, e das isoflavanas, como a faseolina (JEANDET et al., 2014). A indução de fitoalexinas gliceolinas por meio dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia pode estar relacionada ao acúmulo de compostos fenólicos e ao teor de enxofre presente nos extratos dessas plantas, pois, o mesmo é constituinte do aminoácido cisteína, e esse pode atuar na síntese de alguns compostos de defesa da planta, como glucosinolatos e fitoalexinas (BLOEM et al., 2015).

*Calendula officinalis*, em forma de extratos obtidos por extração alcoólica, infusão e maceração também foi capaz de induzir fitoalexinas gliceolinas, assim como estimular a atividade da enzima FAL (MAZARO et al., 2013). Durango et al. (2002), concluíram que cultivares de feijão resistentes ou tolerantes ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, produziram o dobro de fitoalexina faseolina, após a aplicação de  $\text{CuCl}_2$ , que cultivares suscetíveis, e o maior acúmulo de faseolina foi 96 h após a incubação com  $\text{CuCl}_2$ .

O Bion® (acibenzolar-S-metílico) é um ativador de plantas recomendado para o feijão, com ação sobre alguns patógenos, porém, em cotilédones de soja, não apresentou indução de fitoalexinas. Apesar disso, na cultura da soja, o acibenzolar-S-metílico pode atuar como indutor de mecanismos de defesa das plantas, mas Silva et al. (2013) verificaram que nessa cultura o produto não teve efeito sobre o oídio e a ferrugem.

#### **4.4 ATIVIDADE METABÓLICA EM TECIDOS DE FEIJÃO-DE-VAGEM TRATADOS COM EXTRATOS DE CANOLA E MOSTARDA-DA-ÍNDIA**

Em virtude dos resultados obtidos com o teste de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja, demonstrando a eficiência dos extratos de canola e mostarda-da-índia em induzir essas fitoalexinas, concluiu-se que outros testes bioquímicos deveriam ser realizados. Com isso, foram analisadas a atividade das enzimas peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD), fenilalanina amônia-liase (FAL) e a síntese de compostos fenólicos, pois a principal rota metabólica envolvida na síntese de fitoalexinas em plantas superiores é a rota do ácido chiquímico, a qual converte precursores de carboidratos derivados da glicólise em aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (HERRMANN; WEAVER, 1999) e a formação de muitos compostos fenólicos, como cumarinas, antocianinas, lignina e isoflavonas, inicia-se com a fenilalanina (VELINI et al., 2009).

As enzimas POX, SOD e FAL, assim como os compostos fenólicos, apresentaram diferença significativa em função dos tempos de coleta das amostras e dos tratamentos, tanto no experimento sem inoculação como no inoculado com *E. polygoni*, exceto para a enzima SOD no experimento não inoculado (TABELA 5).

**Tabela 5** - Análise de variância para a atividade enzimática da peroxidase (POX), superóxido dismutase (SOD) e fenilalanina amônia-liase (FAL) e quantificação de compostos fenólicos em folhas de feijão-de-vagem não inoculadas e inoculadas com *E. polygoni*, em função do tempo de coleta (TC) e dos tratamentos, testemunha (água), testemunha positiva (água + inóculo), extrato aquoso simples de canola, extrato aquoso simples de mostarda-da-índia (9%), leite cru e Bion. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

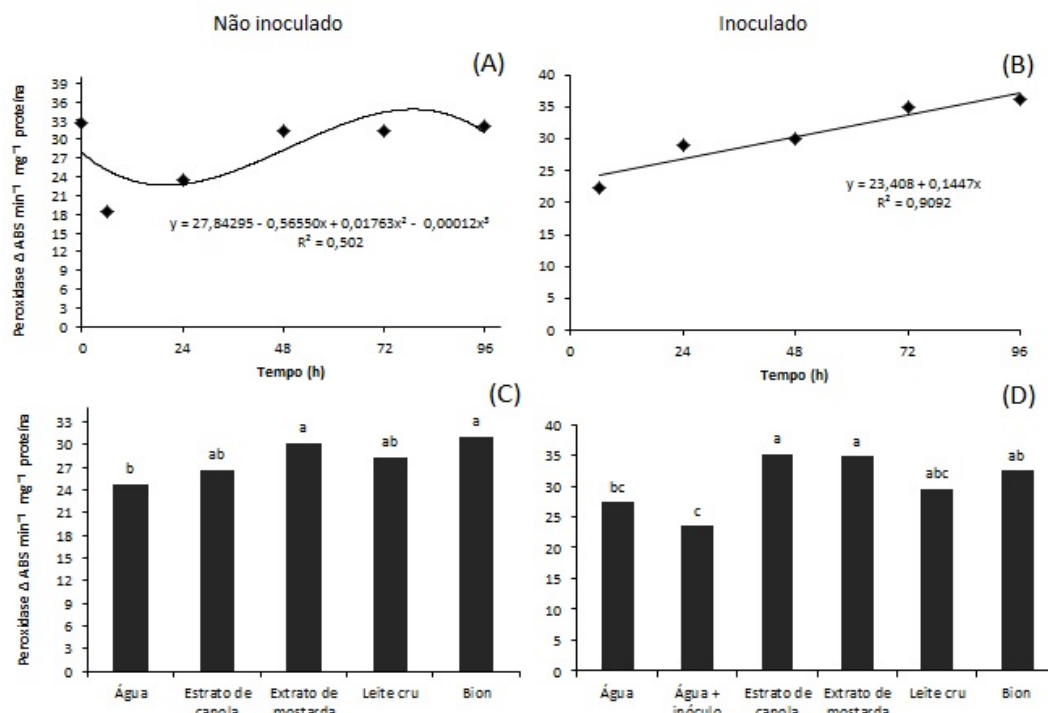
Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		POX	SOD	FAL	Compostos fenólicos
Não inoculado					
Tempo de coleta (TC)	5	853,1926**	17642,6419**	4,29757**	12,38939**
Tratamentos (T)	4	200,55314**	375,89284 <sup>ns</sup>	0,825701*	66,15245**
TC x T	20	150,284866**	1431,79427**	1,243861**	15,54057**
Resíduo	120	39,035125	169,12871	0,288781	3,55118
Coeficiente de variação		11,12%	15,17%	24,92%	7,84%
Inoculado					
Tempo de coleta (TC)	4	900,8179**	25589,2486**	3,91494**	74,03922**
Tratamentos (T)	5	525,27229**	1353,89978**	0,74255**	13,78087**
TC x T	20	119,43717*	998,62458**	0,10212**	11,56149**
Resíduo	120	69,91579	219,00718	0,03603	2,36625
Coeficiente de variação		27,39%	23,50%	15,43%	6,69%

\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro.

\* Significativo a 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> Não significativo.

Na avaliação da atividade da enzima POX, no experimento sem a inoculação do patógeno, o gráfico apresentou efeito cúbico, com picos mais elevados de POX 0, 48, 72 e 96 h após a aplicação dos tratamentos, com tendência de queda após 96 h (FIGURA 19 A). No experimento inoculado, por outro lado, houve efeito linear, com aumento na atividade da POX à medida que aumentou o tempo após a inoculação do patógeno (FIGURA 19 B). Nesse caso, 96 h após as aplicações dos tratamentos a atividade da POX aumentou em 38% em relação ao tempo de 6 h. Esse resultado corrobora com o encontrado por Leite et al. (2014), no qual 96 e 120 h após a inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão, houve os maiores picos de atividade da POX, o que sugere efeito maior do patógeno do que dos indutores, porém, ao serem avaliados individualmente, os tratamentos com os diferentes indutores demonstram a efetividade destes na indução da POX (FIGURA 19 D).



**Figura 19** - Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese de peroxidase ( $\Delta \text{ABS min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ ) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos. (A e C) O primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em seis tempos distintos, e (B e D) o segundo com a inoculação de *E. polygoni*, coletas em cinco tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Não inoculado, dados transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

Analisando o comportamento da enzima nas Figuras A e B, sugere-se que os produtos influenciaram a atividade da POX, porém, quando houve a inoculação do patógeno, essa atividade foi maior quanto mais o tempo passou após a inoculação. Essa reação indica que o patógeno acelera a ativação da enzima (CONRATH et al., 2002).

As peroxidases catalizam a oxidação de álcoois fenólicos à lignina, promovendo modificações na parede celular, conferindo-a maior resistência das paredes hidrolíticas e aumentando a resistência das paredes contra a difusão de toxinas liberadas pelo patógenos (RESENDE et al., 2007).

No experimento não inoculado, de maneira geral, os tratamentos extrato de mostarda-da-índia e Bion® foram os que tiveram maior atividade da POX, sendo 18 e 20%, respectivamente, maior que o tratamento controle (água), mas não

diferiram significativamente do extrato de canola e do leite cru (FIGURA 19 C). Quando se avaliou as interações tempo x tratamentos, foi possível verificar que as plantas tratadas com o Bion® sintetizaram maior quantidade de POX no tempo 0 h, as plantas tratadas com o extrato de mostarda-da-índia sintetizaram mais nos tempos de 0 e 48 h, mas somente o tempo de 48 h diferiu da testemunha, e com extrato de canola, o pico de POX foi 72 h após a aplicação do tratamento (TABELA 6).

**Tabela 6** - Efeito da interação tempo x tratamentos na síntese da enzima peroxidase ( $\Delta$  ABS  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  prot), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos ( $\Delta$ ABS $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína)				
	Água	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
0	24,58 bA	27,40 bB	34,51 abA	29,39 bA	47,08 aA
6	19,53 aA	15,35 aC	19,30 aC	23,28 aA	15,10 aC
24	21,25 aA	25,79 aB	22,37 aBC	24,27 aA	23,75 aBC
48	27,52 bcA	22,75 cBC	40,92 aA	28,96 abcA	36,85 abAB
72	28,47 bA	40,44 aA	31,56 abBC	28,71 abA	27,93 bBC
96	27,75 aA	27,99 aAB	33,07 aBC	35,17 aA	36,14 aAB
CV%	11,12				

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

Quando as plantas foram inoculadas com o patógeno, todos os tratamentos foram superiores ao controle positivo (água + inóculo), sendo os extratos de canola e mostarda-da-índia mais eficientes na síntese da POX, com atividade enzimática 20% acima do controle, mas foram estatisticamente iguais ao Bion® e leite cru (FIGURA 19 D).

Na interação tempo x tratamento (TABELA 7), no experimento com inoculação, os melhores resultados foram obtidos com o extrato de mostarda-da-índia, 72 e 96 h após a inoculação do patógeno, com o extrato de canola após 72 h e o Bion® após 96 h.



**Tabela 7** - Efeito da interação tempo x tratamentos na síntese da enzima peroxidase ( $\Delta$  ABS  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  prot), no experimento com a inoculação de *E. Polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos ( $\Delta$ ABS $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína)					
	Água	Água + inóculo	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
6	13,36 bB	19,27 abA	29,96 aA	23,93 abB	23,08 abA	24,77 abB
24	28,64 aA	23,52 aA	34,42 aA	25,96 aB	28,80 aA	32,65 aAB
48	24,26 aAB	27,17 aA	34,88 aA	31,94 aBC	32,25 aA	30,18 aAB
72	36,53 abA	25,67 bA	42,67 aA	44,53 aAB	29,47 abA	31,26 abAB
96	33,92 abA	22,23 bA	34,42 abA	48,27 aA	34,30 abA	43,55 aA
CV%	27,39					

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

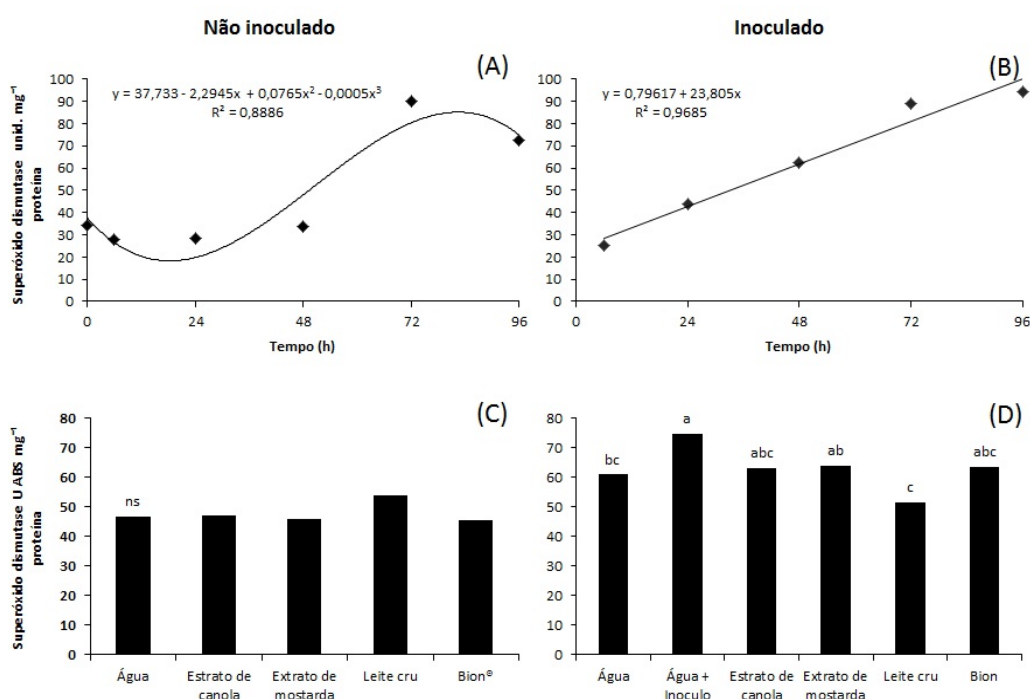
No experimento inoculado (FIGURA 19 D), os extratos de canola e mostarda-da-índia, apresentaram maior atividade da POX do que as testemunhas positiva e negativa, e também a atividade foi maior que no experimento não inoculado (FIGURA 19 C). Essa resposta indica que quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis as alterações em seu metabolismo. No entanto, quando comparada à planta induzida com o mesmo elicitor e, posteriormente, desafiada com patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas induzida, evidenciando que a planta está mais apta para responder a presença do patógeno (KUHN et al., 2006).

No trabalho realizado por Campos et al. (2004), foi avaliado o efeito indutor do ácido salicílico em plantas feijão, 72 h após a aplicação, e os autores também verificaram aumento na atividade da enzima peroxidase antes e após a inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, indicando ação do indutor.

As POX estão envolvidas na formação de compostos que funcionam como barreiras contra agentes patogênicos, como a lignina, que se forma na parede celular em resposta à indução de patógenos. As POX também participam da síntese das fitoalexinas, da oxidação de compostos fenólicos e no metabolismo das espécies reativas de oxigênio, utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como um substrato (SCHWAN-STRADA et al., 2008).

Na quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD), no experimento não inoculado, o pico de atividade enzimática da SOD foi observado após 72 h de aplicação dos tratamentos, sendo 62% maior que no tempo de 0 h, e

com uma pequena queda após 96 h (FIGURA 20 A). Entre 0 e 48 h após a aplicação dos tratamentos houve uma pequena alteração na atividade da enzima. No experimento inoculado, no entanto, ocorreu um comportamento linear, havendo aumento na atividade da SOD com o aumento do tempo após a aplicação dos tratamentos (FIGURA 20 B). Nesse experimento também houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a atividade da SOD foi mais elevada no controle água+inóculo, mas não diferiu significativamente dos extratos de canola e mostarda-da-índia e do Bion® (FIGURA 20 D).



**Figura 20** - Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese de superóxido dismutase (U SOD mg<sup>-1</sup>proteína) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em 6 tempos distintos, e o segundo com a inoculação de *E. polygoni*, coletas em 5 tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.  
 Não inoculado, dados transformados para  $\sqrt{(x+0,5)}$ .

O comportamento da SOD foi semelhante ao obtido para POX, com as devidas diferenças, o que sugere a relação entre as enzimas no processo de defesa. Assim como ocorreu com a POX, o inóculo acelerou a ativação da SOD.

Na interação tempo x tratamentos, do experimento sem inoculação, a maior atividade enzimática da SOD, obtida com a aplicação os extratos, foi após 96

h de aplicação do extrato de canola e 72 h para o extrato de mostarda-da-índia. Resultados superiores foram obtidos com o leite cru e com o Bion®, 72 h após as aplicações (TABELA 8).

A atividade da SOD, nos melhores resultados com extratos de canola e mostarda-da-índia superou a testemunha em 29% e 12%, respectivamente. Já, o leite apresentou atividade da SOD 39% superior a testemunha.

No experimento inoculado com o patógeno, o melhor resultado obtido com os extratos de mostarda-da-índia e canola foi 72 h após a inoculação, porém, o extrato de canola não diferiu significativamente da testemunha positiva. Nesse experimento, até mesmo as testemunhas apresentaram alta atividade enzimática da SOD, isso se deve, provavelmente, ao próprio patógeno e talvez à condição de estresse sofrida pelas plantas, como temperaturas mais elevadas em determinado período do experimento (TABELA 9), que chegaram a atingir máximas de 37 °C.

**Tabela 8** - Efeito da interação entre tempo x tratamentos na síntese da enzima superóxido dismutase (U SOD mg<sup>-1</sup>proteína), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos (U SOD mg <sup>-1</sup> proteína)				
	Água	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion
0	38,62 aC	32,05 aBC	29,29 aB	32,10 aC	40,19 aBC
6	17,93 bD	42,70 aB	31,27 abB	25,30 abC	22,90 bC
24	38,69 aC	18,34 bC	29,93 abB	33,79 aC	22,53 aC
48	42,29 aBC	30,48 aBC	33,41 aB	36,59 aC	25,53 aC
72	76,30 cdA	51,16 dB	86,28 bcA	124,09 aA	111,91 abA
96	65,75 bAB	107,52 aA	66,07 bA	72,94 bB	50,64 bB
CV%	15,17				

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 9** - Efeito da interação entre tempo x tratamentos na síntese da enzima superóxido dismutase (U SOD mg<sup>-1</sup> proteína), no experimento com a inoculação de *E. Polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos (U SOD mg <sup>-1</sup> proteína)					
	Água	Água + inóculo	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion
6	20,74 aD	23,17 aC	27,46 aD	27,78 aC	30,03 aB	23,13 aC
24	62,01 aCD	67,15 aB	48,18 abCD	30,20 bC	27,02 bB	29,27 bC
48	41,06 bBC	80,41 aAB	61,78 abBC	60,31 abB	61,26 abA	70,75 aB
72	84,74 abAB	96,98 abA	98,69 abA	105,43 aA	73,60 bA	73,30 bB
96	96,27 abA	105,47 abA	78,90 bcBC	96,13 abA	66,12 cA	121,27 aA
CV%	23,5					

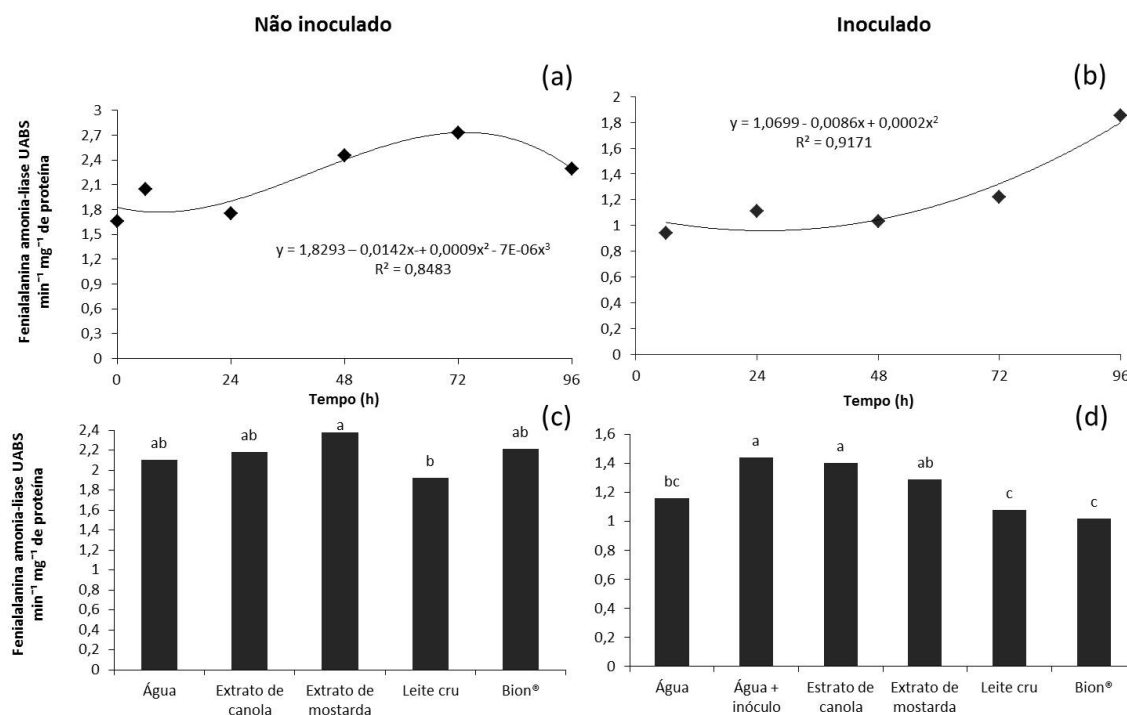
Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey, a 5% de probabilidade de erro.

Leite et al. (2014) avaliaram o efeito de alguns compostos de defesa em cultivares de feijão comum contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e encontraram resultados semelhantes, com plantas de feijão inoculadas apresentando maior atividade enzimática do que as não inoculadas. No entanto, nesse patossistema, os picos de atividade da SOD, para todas as linhas, ocorreu sempre 12 e 120 h após a inoculação do patógeno, e não de maneira linear como ocorreu com o oídio, sendo que o aumento na atividade da SOD foi proporcional ao aumento do tempo após a inoculação. Além disso, os autores observaram que, inicialmente, a maior atividade da SOD e da POX foi próxima ao ponto de inoculação, mas esse não era o foco do trabalho com oídio, por isso não foi mensurado.

As SODs representam uma das primeiras linhas de defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs) na resposta de hipersensibilidade. Estas enzimas são responsáveis pela remoção do anion de superóxido das células, convertendo-o em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, sendo que a POX, além de formar também tem a função de converter o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e O<sub>2</sub>, demonstrando, assim, a relação entre as duas enzimas.

A atividade da FAL, sem a inoculação do patógeno, apresentou uma tendência de aumento as 48 e 72 h após a aplicação dos tratamentos, voltando a declinar após esse período (FIGURA 21 A). O tratamento com maior acúmulo da FAL foi o extrato de mostarda-da-índia, sendo 11,8% maior que da testemunha, mas diferindo significativamente apenas do leite cru (FIGURA 21 C). No experimento inoculado, porém, ocorreu um efeito quadrático na atividade de FAL (FIGURA 21 B),

sendo que a partir do tempo de 48 h após a inoculação do patógeno houve elevação da atividade. Quanto aos tratamentos, nenhum dos produtos aplicados promoveu atividade enzimática superior ao controle positivo (água + inóculo) (FIGURA 21 D).



**Figura 21** - Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, leite cru e o Bion® na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase (UABs min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em seis tempos distintos, e o segundo com a inoculação de *E. Polygoni* e coletas em cinco tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.  
 Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na interação tempo x tratamentos, a maior atividade da enzima FAL foi obtida nas amostras tratadas com extratos de canola e mostarda-da-índia, 72 h após a aplicação dos tratamentos (TABELA 10). Quando houve a inoculação do patógeno, os dois extratos também foram os que apresentaram melhores resultados, porém o pico de atividade enzimática foi 96 h após a inoculação, mas não foram superiores a testemunha água + inóculo (TABELA 11).

**Tabela 10** - Efeito da interação tempo x tratamentos, na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase ( $U\ Abs\ min^{-1}\ mg^{-1}proteína$ ), no experimento sem inoculação. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos ( $U\ ABS\ min^{-1}\ mg^{-1}\ de\ proteína$ )				
	Água	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
0	1,62 aB	0,40 bC	2,01 aB	2,03 aA	2,14 aAB
6	1,96 aB	2,31 aB	1,99 aB	1,82 aA	2,16 aAB
24	1,50 aB	2,16 aB	1,83 aB	1,65 aA	1,59 aB
48	3,02 aA	2,22 abB	2,48 abAB	1,74 bA	2,81 aA
72	2,25 abAB	3,63 aA	3,34 abA	2,24 bA	2,19 bAB
96	2,22 bAB	2,31 aB	2,51 aAB	2,05 bA	2,37 bAB
CV%	24,92				

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

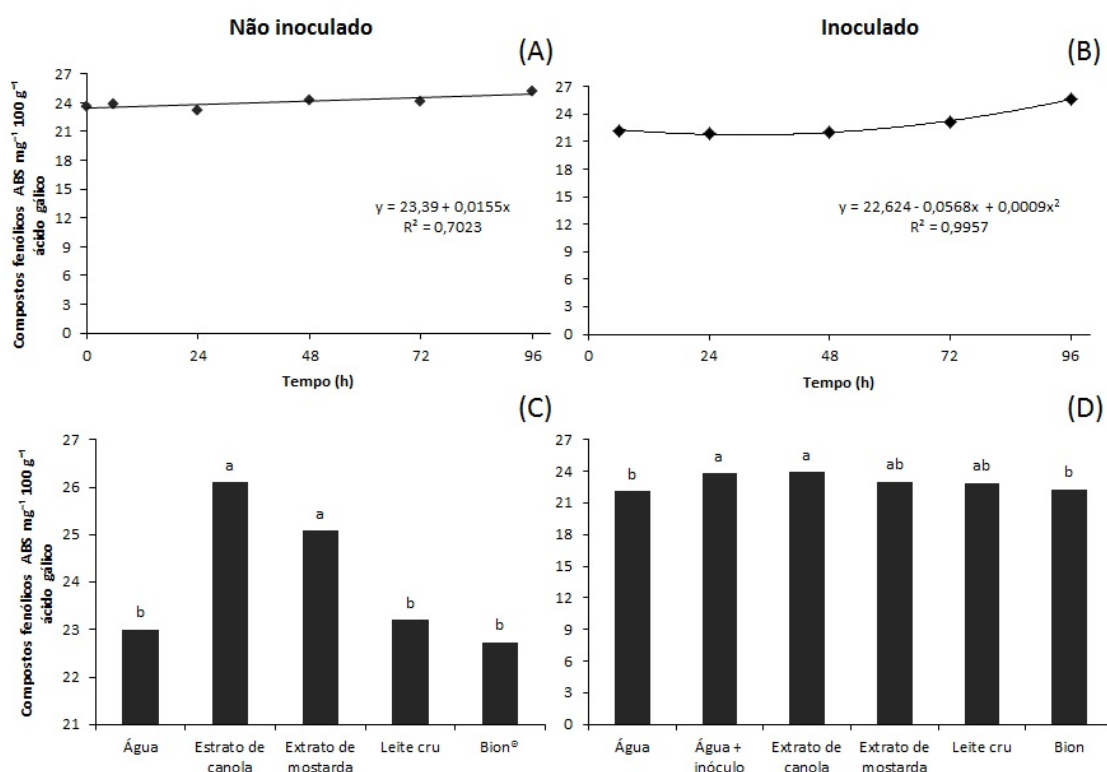
**Tabela 11** - Efeito da interação tempo x tratamentos, na síntese da enzima fenilalanina amônia-liase ( $U\ Abs\ min^{-1}\ mg^{-1}proteína$ ), no experimento inoculado. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos ( $U\ ABS\ min^{-1}\ mg^{-1}\ de\ proteína$ )					
	Água	Água + inóculo	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
6	0,90 abB	1,06 aB	1,11 aBC	1,22 aB	0,66 bC	0,68 bC
24	1,07 abB	1,29 aB	1,31 aBC	1,16 abB	0,88 bBC	0,94 bBC
48	0,87 bB	1,22 aB	0,99 abC	1,16 abB	1,14 abB	0,82 bC
72	1,15 aB	1,35 aB	1,40 aB	1,09 aB	1,16 aB	1,16 aAB
96	1,79 cdA	2,26 aA	2,18 abA	1,84 bcA	1,55 cdA	1,48 dA
CV%	15,43					

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

Para verificar a relação da atividade da FAL e produção de fenóis solúveis totais, avaliou-se a produção destes compostos. Nesse teste houve diferença significativa na produção de compostos fenólicos em função dos tempos de coleta das amostras após a aplicação dos tratamentos e também em função dos tratamentos, tanto no experimento sem inoculação, como no experimento inoculado com patógeno (FIGURA 22). Em ambos os experimentos, o maior acúmulo de compostos fenólicos ocorreu quando a coleta foi realizada 96 h após a aplicação dos tratamentos. No experimento não inoculado, o aumento dos compostos fenólicos 96 h após as aplicações foi de 7,1% e no inoculado foi de 15,5%, quando comparados com o tempo de 0 e 6 h, respectivamente (FIGURA 22 A e B). Esse resultado indica que, independente do produto aplicado, o acúmulo de compostos

fenólicos aumentou com o decorrer do tempo após as aplicações. A resistência induzida exige mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, por isso, então, é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento indutor e a subsequente inoculação do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995).



**Figura 22** - Comparação entre os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia, leite cru e o Bion® no acúmulo de compostos fenólicos (ABS  $\text{mg}^{-1}$   $100\text{g}^{-1}$  de ácido gálico) em plantas de feijão-de-vagem em dois experimentos, sendo o primeiro sem inoculação, com amostras coletadas em 6 tempos distintos, e o segundo com a inoculação de *E. polygona*, coletas em 5 tempos distintos. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

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

O ácido *trans*-cinâmico, proveniente da desaminação da L-fenilalanina, pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos, portanto, os mesmos fatores que influenciam na atividade da FAL, também o farão no acúmulo de compostos fenólicos. Com isso, existe uma correlação entre a atividade enzimática da FAL com a produção de compostos fenólicos e, conseqüentemente, de flavonoides, lignina e fitoalexinas, pois os compostos fenólicos fazem parte da

constituição dos demais (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Com isso, é possível observar que, para a maioria dos tratamentos, o acúmulo de compostos fenólicos foi maior onde houve maior atividade da enzima FAL (FIGURAS 21 e 22).

Na comparação entre os tratamentos, os extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia apresentaram maior acúmulo de compostos fenólicos quando comparados com os demais tratamentos no experimento não inoculado (FIGURA 22 C). Esse acúmulo foi de 13,5% para o extrato de canola e 9% para a mostarda-da-índia, comparados ao tratamento controle (água). No experimento onde houve a inoculação do patógeno, os melhores resultados foram do controle água+inóculo e do extrato de canola, porém, não diferiram significativamente do extrato de mostarda e do leite cru (FIGURA 22 D). Os extratos de canola e mostarda-da-índia induziram a produção de compostos fenólicos em plantas de feijão-de-vagem com ou sem a presença do patógeno.

O maior acúmulo de compostos fenólicos para o extrato de canola foi em 0 h após a aplicação e para o extrato de mostarda-da-índia em 96 h, mas estatisticamente sem diferença entre os tempos, porém, a maioria foi superior à testemunha (TABELA 12). No caso do leite cru, o maior acúmulo ocorreu após 48 h. Quando houve a inoculação do patógeno, o melhor resultado foi obtido com a testemunha positiva, 96 h após a inoculação. Provavelmente essa resposta ocorreu por fatores alheios aos tratamentos, tais como estresse hídrico, presença de algum inseto, danos possíveis danos sofridos pelas plantas. O extrato de canola foi melhor no tempo de 6, 72 e 96 h, mas, somente nos tempo de 6 e 72 h é que diferiu da testemunha (TABELA 13).



**Tabela 12** - Efeito da interação tempo x tratamentos, no acúmulo de compostos fenólicos (ABS mg<sup>-1</sup> 100g<sup>-1</sup> de ácido gálico), no experimento sem a inoculação de *E. Polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos (ABS mg <sup>-1</sup> 100 g <sup>-1</sup> ácido gálico)				
	Água	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
0	21,23 cB	30,63 aA	24,58 bA	21,67 bcAB	19,58 cC
6	22,68 bAB	26,10 aB	24,45 abA	23,07 abAB	22,81 abABC
24	23,14 abAB	24,22 abB	26,06 aA	21,50 bB	20,93 bBC
48	23,10 aAB	25,25 aB	24,80 aA	25,07 aA	23,10 aAB
72	22,74 aAB	24,67 aB	23,86 aA	24,33 aAB	25,16 aA
96	25,15 aA	25,76 aB	26,73 aA	23,58 aAB	24,82 aA
CV%	7,84				

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 13** - Efeito da interação tempo x tratamentos, no acúmulo de compostos fenólicos (ABS mg<sup>-1</sup> 100g<sup>-1</sup> de ácido gálico), no experimento inoculado com *E. Polygoni*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tempo (h)	Tratamentos (ABS mg <sup>-1</sup> 100g <sup>-1</sup> de ácido gálico)					
	Água	Água + inóculo	Extrato de canola	Extrato de mostarda	Leite cru	Bion®
6	20,83 bBC	22,17 bB	25,39 aA	22,24 bB	22,38 bA	20,39 bB
24	19,91 bC	22,41 bB	23,59 aAB	20,92 abB	22,02 abA	22,75 aAB
48	22,74 aAB	21,58 aB	21,08 aB	22,23 aB	21,97 aA	22,42 aAB
72	21,85 bBC	22,90 abB	25,01 aA	23,36 abB	24,31 abA	21,63 bB
96	25,17 bA	29,93 aA	24,45 bA	26,23 bA	23,89 bA	24,35 bA
CV%	6,69					

Médias com a mesma letra minúscula, na linha, e maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro.

Os compostos fenólicos, que são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes, são tóxicos aos patógenos (BARROS et al., 2014). Esses compostos são produzidos pelas plantas e encontrados, em geral, no vacúolo celular. As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos são as vias do ácido chiquímico e cinâmico (fenilpropanoides), que constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina. Esses compostos são conhecidos como substâncias fungitóxicas, podendo inibir a germinação de esporos, o crescimento micelial e a produção/atividade de enzimas microbianas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Surhane (2013) testou os extratos de sementes de anis (*Pimpinella anisum* L.), folhas de eucalipto (*Eucalyptus glóbulos* Labill.), Camomila (*Matricaria chamomilla* L.), sementes de cominho (*Cuminum cyminum* L.), plantas de manjerona (*Majorana hortensis* L.) e tomilho (*Thymus vulgais* L.) no controle de oídio em abóbora e verificou que todos os extratos testados aumentaram os níveis de compostos fenólicos nas folhas. Além disso, os extratos metanólicos de eucalipto e tomilho, além do aumento nos níveis de compostos fenólicos, reduziram a incidência do oídio.

O extrato metanólico de casca de castanha de caju reduziu a germinação de conídios de *Erysiphe pisi*, *in vitro*, de maneira proporcional ao aumento da concentração do extrato e, em casa-de-vegetação reduziu a germinação dos conídios em folhas de ervilha, assim como a severidade da doença, em todas as concentrações testadas. Na extração de compostos fenólicos, apenas o ácido gálico foi encontrado de maneira consistente, principalmente 6 h após a aplicação do extrato. Os outros compostos analisados (ácido ferúlico, clorogênico e cinâmico) apareceram em pequena quantidade, de maneira inconsistente (BAHADUR et al., 2008).

## 5 CONCLUSÕES

As concentrações dos extratos aquosos de canola e mostarda-da-índia que mais inibiram a germinação de conídios e a formação de apressório de *E. polygoni*, assim como a severidade do oídio, foram de 9 e 12%. De maneira geral todos os métodos de preparo dos extratos foram eficientes no controle do fungo, mas os que mais se destacaram foram o aquoso simples e macerado. Esse comportamento demonstra que houve efeito de compostos voláteis com ação fungitóxica e pode ter ocorrido efeito direto, com ação fungistática.

Outro mecanismo de ação que pode ter influenciado esse patossistema é o da indução de resistência, por meio da ativação das enzimas POX, SOD e FAL, resultando no acúmulo de compostos fenólicos e fitoalexinas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de canola e mostarda-da-índia apresentaram potencial para o controle do oídio em feijão-de-vagem e, podem vir a ser uma opção como controle alternativo ao controle químico.

A utilização dos extratos pode ser associada com outras formas de manejo, ao controle cultural, físico, químico, entre outros, potencializando assim, o controle do oídio.

Os extratos de brássicas podem ser testados e aplicados contra outras doenças foliares, tendo em vista que são mais seguros para o meio ambiente e para a nossa saúde que os produtos químicos.

Novos testes precisam ser realizados, *in vitro* e *in vivo*, para comprovar o efeito dos compostos voláteis liberados pelas brássicas, no controle do oídio. Também devem ser analisadas a ativação de outras enzimas relacionadas a respostas de defesa da planta contra patógenos.

## REFERÊNCIAS

ADAPAR. Cerconil WP. 10p. Disponível em: <[www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/cerconil\\_wp.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/cerconil_wp.pdf)>. Acesso em: 7 de jun de 2016.

AGARWAL, S.K.; SINGH, S.S.; VERMA, S.; KUMAR, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 43–46, 2000.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed., 922 p. Elsevier Academic Press. San Diego, 2005.

AHUJA, I.; ROHLO, J.; BONES, A.M. Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 30, n. 2, p. 311–348, 2010.

ANGUS, J.F.; GARDNER P.A; KIRKEGAARD, J.A.; DESMARCHELIER, J.M. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil*, v. 162, p. 107-112, 1994.

AYERS, A.R.; EBE, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*, v. 57, p. 751-759, 1976.

AZAIÉZ, I.; MECA, G.; MANYES, L.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M. Antifungal activity of gaseous allyl, benzyl and phenyl isothiocyanate in vitro and their use for fumonisins reduction in bread. *Food Control*, v. 32, p. 428-434, 2013.

BAHADUR, A.; SINGH, U.P.; SINGH, D.P.; SARMA, B.K.; SINGH, K.P.; SINGH, A.; AUST, H.J. Control of *Erysiphe pisi* causing powdery mildew of pea (*Pisum sativum*) by cashewnut (*Anacardium occidentale*) Shell Extract. *Mycobiology*, v. 36, n. 1, p. 60-65, 2008.

BARROS, A.F.; CAMPOSA, V.P.; SILVA, J.C.P. DA; PEDROSO, M.P.; MEDEIROS, F.H.V.; POZZA, E.A.; REALE, A.L. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, v. 80, p. 34–43, 2014.

BASF. Fungicidas – Kumulus®DF. Disponível em < [http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt/content/APBrazil/solutions/fungicidas/fungicidas\\_product/KUMULUS\\_DF](http://www.agro.basf.com.br/agr/ms/apbrazil/pt/content/APBrazil/solutions/fungicidas/fungicidas_product/KUMULUS_DF)>. Acesso em 29 de maio de 2016.

BASSO, J.M.; TAKAHASHI, H.W.; FREGONEZI, G.A. de F. Cultivo de feijão-vagem em vaso em diferentes substratos e condutividades elétricas da solução nutritiva. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 6, p. 2149-2162, 2012.

BELLOSTAS, N.; SORENSEN, J.C.; SORENSEN, H. Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria*, v. 3, n. 3, p. 5-10, 2004.

BETTIOL, W. **Leite de vaca cru para o controle de oídio**. Comunicado técnico 14 (EMBRAPA), Jaguariúna-SP, 2004.

BIANCHINI, A., MARINGONI, A.C., CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do Feijoeiro. In: *Manual de Fitopatologia*, v.2. Doenças das Plantas Cultivadas. Ed. Agr. Ceres. São Paulo, 1997.

BIELESKI, R. L; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layerel ectrophoresis and chomatograghy. *Analitycal Biochemistry*, v. 17, p. 278-293, 1966.

BIZI, R.M.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C.G.; MAY DE MIO, L. L. Produtos alternativos no controle do oídio em mudas de eucalipto. *Summa Phytopathologica*, v. 34, n. 2, p. 144-148, 2008.

BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, article 779, 2015.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R. da S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V. de; ROMEIRO, R. da S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 263 p., 2005.

BOURSIER, C.M.; BOSCO, D.; COULIBALY, A.; NEGRE, M. Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtina. *Crop Protection*, v. 30, p. 318-322, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapidand sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analitycal Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.;HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARNEIRO, S.M. de T.P.G.; PIGNONI, E.; GOMES, J.C. Efeito do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) no controle da mancha angular do feijoeiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 10, n. 3, p. 6-10, 2008.

CARNEIRO, S.M. de T.P.G.; PIGNONI, E.; VASCONCELLOS, M.E DA C.; GOMES, J.C. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CEASA/PR – Centrais de Abastecimento do Paraná S.A. **Boletim Técnico Ceasa/PR**. Curitiba, 94 p., 2012.

CHOI, G.J., LEE, S.W., JANG, K.S., KIM, J.S., CHO, K.Y., KIM, J.C.. Effects of chrysophenol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Protection*, v. 23, p. 1215–1221, 2004.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plantpathogen interactions. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 210-216, 2002.

DAM, N.M.; TYTGAT, T.O.G.; KIRKEGAARD, J.A. Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem Reviews*, v. 8, p. 171–186, 2009.

DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology*, v. 49, p. 324-332, 2000.

DEVAIAH, S.P.; MAHADEVAPPA, G.H.; SHETTY, H.S. Induction of systemic resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) against downy mildew (*Sclerospora graminicola*) by *Datura metel* extract. *Crop Protection*, v. 28, p. 783–791, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350–356, 1956.

DURANGO, D.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; ECHEVERRI, F. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. *Molecules*, v. 7, p. 817-832, 2002

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de Métodos de Pesquisa em Feijão**. EMBRAPA CNPAF, Goiânia, 80 p., 1976.

FELTRIM, A.L.; CECÍLIO FILHO, A.B.; REZENDE, B.L.A; BARBOSA, J.C. Produção de chicória em função do período de cobertura com tecido de polipropileno. *Horticultura Brasileira*, v. 24, n. 2, p. 249-254, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 412 p., 2003.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 25, n. 2, p. 503-507, 2003.

GARCÍA, M.R.; LÓPEZ, M.H.; NECHA, L.L.B.; BAÑOS, S.B. *In vitro* response of *Fusarium oxysporum* isolates to isothiocyanates application. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2011.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal, Uberlândia*, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, p. 309-314, 1977.

GUERRERO-DIAZ, M.M.; LACASA-MARTINEZ, C.M.; HERNANDEZ-PIÑERA, A.; MARTINEZ-ALARCON, V.; LACASA PLASENCIA, A. Evaluation of repeated biodisinfestation using *Brassica carinata* pellets to control *Meloidogyne incognita* in protected pepper crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 11, n. 2, p. 485-493, 2013.

HANAA, R.M.F.; ABDOU, Z.A.; SALAMA, D.A.; IBRAHIM, M.A.R.; SROR, H.A.M. Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Science*, v. 56, p. 1-7, 2011.

HECK, D.W. **Efeito do extrato do pó de canola sobre oídio em pepino**. Monografia (Trabalho de conclusão de curso), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco. Curso de Agronomia, 45 f., 2012.

HELDWEIN, A.B.; STRECKI, N.A.; STURZA, V.S.; LOOSE, L.H.; ZANON, A.J.; TOEBE, M.; SOUZA, A.T. de; PETERS; M.B.; KARLEC, F.; Plastocrono e rendimento de feijão-de-vagem cultivado sob ambiente protegido e no ambiente externo em semeadura tardia no outono. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 768-773, 2010.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, I. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 473-503, 1999.

HYODO, H.; KURODA, H. & YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiology*, n. 62, p. 31-35, 1978.



IBGE. **Censo Agropecuário 2006.** Disponível em: <[www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/.../Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/.../Brasil_censoagro2006.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

JEANDE, P.; HÉBRARD, C.; DEVILLE, M.A.; CORDELIÉ, S.; DOREY, S.; AZIZ, A.; CROUZET, J. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*, v. 19, p. 18033-18056, 2014.

KAPLAN, L. What is the origin of the common bean. *Economic Botany*. *Economic Botany*, v. 35, n. 2, p. 40-257, 1981.

KIRKEGAARD, J.A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*, n. 201, p. 71–89, 1998.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas.** São Paulo: Ceres, 2005.

KOENRAAD, F.M.J.T.; BART, P.H.J.T.; BROUWER, M.; SCHMIDT, J.; KISTNER, K.; PORZEL, A.; MAUCH-MANI, B.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. Study of the Role of Antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens. *Plant Physiology*, v. 125, p. 1688-1699, 2001.

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (E Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. *Crop Protection*, v. 11, n. 8, p. 649-656, 1999.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; CARDOSO FILHO, J.A.; PORTZ, R.L.; OSWALD, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. In: LUZ, W.C. (Ed.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 14, p. 249-300, 2006.

LAGE, D.A. da C. **Fumigação de solo com óleo essencial de mostarda para o controle da murcha de fusário em tomateiro.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009.

LARKIN, R.P.; GRIFFIN, T.S. Control of soilborne potato diseases using brassica green manures. *Crop Protection*, n. 26, p. 1067–1077, 2007.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, v. 50, p. 85–93. 2009.

LEITE, M.E.; SANTOS, J.B.; RIBEIRO JR., P.M.; SOUZA, D.A.; LARA, L.A.C.; RESENDE, M.L.V. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 138, p. 391–404, 2014.

LOPEZ, S.E; RIVERA, M.C. **Biología y patología de los oídios**. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. Oídios, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 59-78, 2001.

MARCHESE, J. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. *Photosynthetica*. v. 46. p. 501-505. 2008.

MARTINEZ, S.S. Composição do nim. In: MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 23-30, 2002.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M.D.C.; MORENO, D.A.; CARVAJAL, M. The Physiological Importance of Glucosinolates on Plant Response to Abiotic Stress in *Brassica*. (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 11607-11625, 2013.

MASHEVA, S.; LAZAROVA, T.; VELKOV, N.; VELICHKOV, G. Botanical products against powdery mildew on cucumber in greenhouses. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* (Special Issue), v. 2, p. 1707-1712, 2014.

MATTHIESSEN, J.N.; KIRKEGAARD, J.A. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews of Plant Science*, v. 25, p. 235–265, 2006.

MAZARO, S.M.; FOGOLARI, H.; WAGNER JÚNIOR, A., CITADIN, I.; SANTOS, I. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 2, p. 208-216, 2013.

McGRATH, M.T. Successful management of powdery mildew in pumpkin with disease threshold-based fungicide programs. *Plant disease*, v. 80, p. 910-916, 1996.

MEDEIROS, F. H.V.; BETTIOL, W.; SOUZA, R.M.; ALVES, E.; PINTO, Z.V.; IOST, R. Microorganisms, application timing and fractions as players of the milk-mediated powdery mildew management. *Crop Protection*, n. 40, p. 8-15, 2012.

MICELI, A.; ALEO, A.; CORONA, O.; SARDINA, M.T.; MAMMINA, C.; SETTANNI, L. Antibacterial activity of *Borago officinalis* and *Brassica juncea* aqueous. *Food Control*, v. 40, p. 157-164, 2014.

MORRA, M.; BOREK, V. Glucosinolate preservation in stored Brassicaceae seed meals. *Journal of Stored Products Research*, v. 46, p. 98–102, 2010.

MORRA, M.J.; KIRKEGAARD, J.A. Isothiocyanate release from soil-incorporated brassica tissues. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 34, p. 1683–1690, 2002

NASIR, M.; MUGHAL, S.M.; MUKHTAR, T.; AWAN, M.Z. Powdery mildew of mango: A review of ecology, biology, epidemiology and management. *Crop Protection*, v. 64, p. 19-26, 2014.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; PARREIRA, D.F.; FERRAZ, S.; COSTA, M.D. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, v. 31, n. 3, 2007.

NICHOLSON, R.L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. *Summa Phytopathologica*, v. 21, p. 95-99, 1995.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. 1995. p. 417-454.

PASINI, C.; D'AQUILA, F.; CURIR, P.; GULLINO, M.L. Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection*, v. 16, p. 251-256, 1997.

PEIXOTO, N.; MORAES, E.A.; MONTEIRO, J.D.; THUNG, M.D.T. Seleção de linhagens de feijão-vagem de crescimento indeterminado para cultivo no Estado de Goiás. *Horticultura Brasileira*, v.19, n.1, p.85-88, 2001.

PERINA, F.J.; ALVES, E.; PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; LABORY, C.R.G.; CASTRO, H.A. Essential oils and whole milk in the control of soybean powdery mildew. *Ciência Rural*, v. 43, n. 11, p. 1938-1944, 2013.

PINTO, C.M.F.; VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; CALDAS, M.T. Idade de colheita do feijão-vagem anão cultivar Novirex. *Horticultura Brasileira*, v.19, n.1, p.163-167, 2001.

PIVA, C.A.G. **Extratos de canola e própolis no controle de oídio em pepineiro.** Dissertação (Mestre em Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, 91 f., 2013.

PORTER, A.J.R.; MORTON, A.M.; KIDDLE, G.; DOUGHTY, K.J.; WALLSGROVE, R.M. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Effect of leaf age and position. *Annals Applied Biology*, v. 118, p. 461–467, 1991.

PRELA, A.; RIBEIRO, A.M.A. Determinação de graus-dia acumulados e sua aplicação no planejamento do cultivo de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) para Londrina-PR. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, v. 10, n. 1, p. 83-86, 2002.

RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia brasileira*, v. 32, n. 3, 2007.

RODRIGUES, A.A.C.; NETO, E.B.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, M.A.T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo frac.** Dissertação (Mestrado em Agronomia), UNESP, Botucatu, 2006.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SANGEETHA, G.; THANGAVELU, R.; RANI, S.U.; MUTHUKUMAR, A. Antimicrobial activity of medicinal plants and induction of defense related compounds in banana fruits cv. Robusta against crown rot pathogens. *Biological Control*, v. 64, p. 16–25, 2013.

SARTORATO, A.; YORINI, J.T. **Oídios de leguminosas: feijoeiro e soja.** In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. Oídios, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 255-284, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SEGARRA, G.; REIS, M.; CASANOVA, E.; TRILLAS, M.I. control of powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) in tomato by foliar applications of compost tea. *Journal of Plant Pathology*, v. 91, n. 3, p. 683-689, 2009.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHAPIRO, T.A.; FAHEY, J.W.; WADE, K.L.; STEPHENSON, K.K.; TALALAY, P. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: Metabolism

and excretion in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 10, p. 501–508, 2001.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases - an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*. v. 12, p. 303-312. 1993.

SILVA, O.C.; SANTOS, HA.A.A; DESCHAMPS, D.; DALLA PRIA, M.; MAY DE MIO, L.L. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metílico associados a fungicidas para o controle de doenças foliares na cultura da soja. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, n. 1, p. 72-77, 2013.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Documento 250). p. 49, 2008.

SILVA, M.D.D.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; ZAUZA, E.A.V. Germinação de conídios de *Sphaerotheca pannosa* obtidos de eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 674-681, 2003.

SMOLINSKA, U.; HORBOWICZ, M. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Institute of vegetable crops*, v. 3, p. 96-100, 1999.

SMOLINSKA, U.; MORRA, M.J.; KNUDSEN, G.R.; JAMES, R.L. Isothiocyanates produced by brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, v. 87, n. 4, 2003.

SONG, L.; THORNALLEY, P.J. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 216–224, 2007.

STADNIK, M.J. **História e taxonomia de oídios**. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. Oídios, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 3-30, 2001.

STANGARLIN J.R.; SCHWAN-ESTRADA K.R.F.; CRUZ M.E.S.; NOZAKI M.H. Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 11, p. 16-24, 1999.

SURHANEE, A.M.A. Efficiency of the extracts of some plants on squash powdery mildew. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, v. 4, n. 11, p. 39-49, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2004, 722 p.

TOUBA, E. P.; ZAKARIA, M.; TAHEREH, E. Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in vitro. *Microbial Pathogenesis*, v. 52, p. 125-129, 2012.

TUMURA, K.G.; PIZETTA, M.; SILVA, L.L.; FURTADO, E.L. Avaliação de clones de seringueira quanto à resistência ao oídio. *Summa Phytopathologica*, v. 39, n. 4, p. 252-257, 2013.

UGOLINI, L.; MARTINI, C.; LAZZERI, L.; D'AVINO, L.; MARI, M. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allylthiocyanate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, v. 90, p. 34-39, 2014.

VECHET, L.; BURKETOVA, L.; SINDELAROVA, M. A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) in wheat under field conditions. *Crop Protection*, v. 28, p. 151-154, 2009.

VEITCH, N.C.; ELLIOTT, P.C.; KITE, G.C.; LEWIS, G.P. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). *Phytochemistry*, v. 71, p. 479-486, 2010.

VELINI, E.D.; ALVES, E.; GODOY, M.C.; MESCHEDE, D.K.; SOUZA, R. T.; DUKE, S. O. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, v. 4, p. 489-96, 2008.

VIDAL, V.L.; JUNQUEIRA, A.M.R.; PEIXOTO, N.; MORAES, E.A. Desempenho de feijão-vagem arbustivo, sob cultivo orgânico em duas épocas. *Horticultura Brasileira*, n. 25, p. 010-014, 2007.

WEERAKOON, D.M.N.; REARDON, C.L.; PAULITZ, T.C.; IZZO, A.D.; MAZZOLA, M. Long-term suppression of *Pythium abappressorium* induced by *Brassica juncea* seed meal amendment is biologically mediated. *Soil Biology & Biochemistry*, n. 51, p. 44-52, 2012.

WILSON E.A.; ENNAHAR, S.; ZHAO, M.; BERGAENTZLE, M.; MARCHIONI, E.; BINDLER, F. Simultaneous determination of various isothiocyanates by RP-LC following precolumn derivatization with mercaptoethanol. *Chromatographia*, v. 73, p. S137-S142, 2011.

WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WUE, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Crop Protection*, v. 30, p. 33-37, 2011.

YANG, X.; MA, X.; YANG, L.; YU, D.; QIAN, Y.; NI, H. Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. *Crop Protection*, v. 28, p. 1031–1035, 2009.

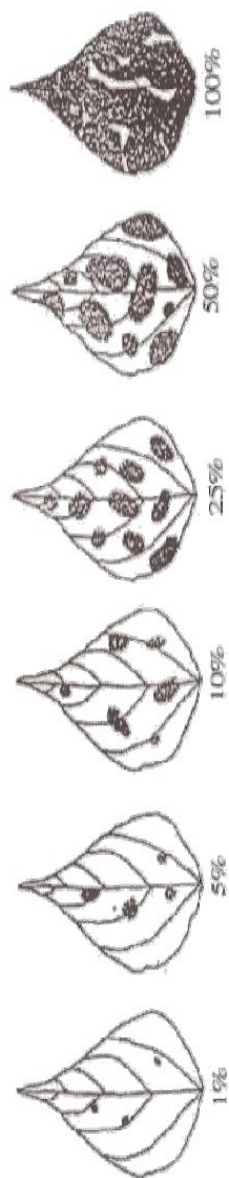
ZHANG, Z.Y.; DAI, G. H.; ZHUGE, Y.Y.; LI, Y. B. Protective effect of *Robinia pseudoacacia* Linn1 extracts against cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Crop Protection*, v. 27, p. 920–925, 2008.

ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology*, v. 20, n. 3, p. 321-331, 1982.

**ANEXOS**



## ANEXO A – ESCALA DIAGRAMÁTICA UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DO OÍDIO EM FEIJÃO-DE-VAGEM



**Figura 1** – Escala diagramática utilizada para avaliação da área foliar infectada por oídio em folhas de feijão-caupi (EMBRAPA, 1976).