



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
*CAMPUS* PATO BRANCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



VANESSA NATALINE TOMAZELI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM MORANGUEIRO COM  
O USO DE ACIBENZOLAR-S-METIL E HARPINA EM PRÉ E PÓS-  
COLHEITA**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO  
2010

VANESSA NATALINE TOMAZELI

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM MORANGUEIRO COM  
O USO DE ACIBENZOLAR-S-METIL E HARPINA EM PRÉ E PÓS-  
COLHEITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

PATO BRANCO  
2010

T153i

Tomazeli, Vanessa N.

Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de Acibenzolar-S-Metil e Harpina em pré e pós-colheita / Vanessa N. Tomazeli. Pato Branco. UTFPR, 2010

xvi, 86 f. : il.; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Co-orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2010.

Bibliografia: f. 81 – 96

1. Indutores. 2. Morango. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Santos, Idalmir dos, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de acibenzolar-S-metil e harpina em pré e pós-colheita.

CDD: 630

Ficha Catalográfica elaborada por

Elda Lopes Lira CRB 9/1295

Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



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



## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 021


**Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de acibenzolar-s-metil e harpina em pré e pós-colheita**

por

**Vanessa Nataline Tomazeli**

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e dez, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. ....

Banca examinadora:

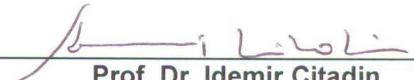
  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Kátia Freitas Schwan-Estrada**  
UEM

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Sérgio Miguel Mázaro**  
UTFPR

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Marisa de Cacia Oliveira**  
IAPAR

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Abramo Marchese**  
UTFPR  
Orientador

Visto da Coordenação:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Idemir Citadin**  
Coordenador do PPGA

O senhor é meu pastor, nada me faltará.

Em verdes prados ele me faz repousar.

Conduz-me junto às águas refrescantes,

restaura as forças de minha alma.

Pelos caminhos retos ele me leva,

por amor do seu nome.

Ainda que eu atravessasse o vale escuro,

nada temerei pois estais comigo.

[...]

A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me

por todos os dias da minha vida.

E habitarei na casa do senhor por longos dias.

*“Salmo 22”.*

## DEDICO

A Deus, por abrir caminhos. Por mais esta conquista.

Ao meu pai, Idimor Luiz Tomazeli, pela sua dedicação a mim e minha irmã, pela nossa educação básica e pelo contínuo incentivo ao nosso crescimento.

À minha irmã, Andressa Jaqueline Tomazeli, que iniciou sua jornada acadêmica no mesmo período que iniciei este mestrado. Para que lhe sirva como exemplo de que devemos buscar sempre nosso crescimento intelectual.

Ao meu namorado, Deoclécio Kohl, por compreender a importância deste mestrado para meu amadurecimento profissional.

À minha grande amiga e irmã de coração, Leila Ângela Tirelli, por estar sempre presente nos momentos felizes e também nas horas de dificuldade.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas inúmeras oportunidades;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal – UTFPR *Campus* Pato Branco;

A CAPES pelos seis meses de bolsa;

Ao Prof. Dr. José Abramo Marchese pela orientação, disponibilidade e apoio;

Ao Prof. Co-orientador Idalmir dos Santos pela colaboração;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa de Cacia Oliveira pelo auxílio nas análises bioquímicas;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal, pela disponibilidade de trabalho;

Às colegas e amigas, Cristiane Bolina e Rafaeli Cristina Negri, pela imensa ajuda, confiança e amizade durante esta jornada;

Aos amigos e colegas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela caminhada conjunta;

A toda minha família e amigos, pelo estímulo durante esta importante etapa de realização profissional.

Aos colegas de trabalho Gabriela Marcheti Girardi, Cézar Paulo Beviláqua, Vanderlei Dalbosco e Silvana Catarina Nunes pelo incentivo inicial para que eu pudesse ser liberada semanalmente do trabalho para cursar este mestrado.

## RESUMO

TOMAZELI, Vanessa Nataline. Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de acibenzolar-S-metil e harpina em pré e pós-colheita. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato branco, 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos eliciadores acibenzolar-S-metil (ASM) e da proteína harpina em pré e pós-colheita na indução de resistência a *Botrytis cinerea*, causador do mofo-cinzento em morangos, e sobre outros agentes infestantes. Quatro experimentos foram conduzidos, dois deles em pré-colheita, e outros dois em pós-colheita. No primeiro experimento (1) em pré-colheita, conduzido em casa-de-vegetação, testou-se dois produtos à base de harpina (ProAct™ 2,5 g L<sup>-1</sup> com 1% do i.a., e Messenger® 0,75 g L<sup>-1</sup> com 3% do i.a) e um à base de ASM (Bion® 500WG 0,5 g L<sup>-1</sup> com 50% do i.a.), mais a testemunha (água destilada). Após 24 horas da segunda pulverização dos tratamentos foi realizada inoculação do fungo *B. cinerea* (10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>). Neste experimento foram avaliadas: produtividade, incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma, flores abortadas, incidência de ácaros e incidência de frutos com mofo-cinzento, além do teor de proteínas totais, atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), fenóis totais e taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>. No segundo experimento (2) em pré-colheita, foram testadas doses de harpina (ProAct™ 100, 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>) e de ASM (Bion® 500 WG 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup>), mais a testemunha (água destilada). Após 24 horas da primeira aplicação dos tratamentos foi realizada inoculação de *B. cinerea* (10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>). Neste experimento foram realizadas avaliações para os parâmetros de produtividade, incidência de podridões e taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>. Além disso, após a quarta aplicação dos tratamentos, foram coletados frutos para um dos experimentos (4) em pós-colheita. Foram realizados mais dois experimentos em pós-colheita, e o terceiro experimento (3) foi conduzido em parcelas subdivididas, com e sem ferimentos nos frutos. Os frutos foram pulverizados com ASM (Actigar® 50WG 5,0 mg do i.a. mL<sup>-1</sup>), dois produtos comerciais contendo proteína harpina (80 mg do i.a. L<sup>-1</sup> - ProAct™ e Messenger®) e uma testemunha (água destilada). Para o quarto experimento (4), frutos tratados em pré-colheita com 100, 200 e 300 mg L<sup>-1</sup> ProAct™ (1% de harpina), e 100, 200, 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de Bion® (50% de ASM), mais a testemunha (água destilada). No experimento 3, os tratamentos foram aplicados por meio de pulverização e 12 horas após efetuou-se a inoculação do fungo *B. cinerea* (10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>). Após 48 horas da inoculação os frutos foram avaliados quanto à área lesionada e firmeza de polpa. Foi coletada amostra do material vegetal para análise do teor de proteínas totais e da atividade da FAL. Os frutos do experimento 4 foram colhidos do experimento 2, depois da quarta aplicação dos tratamentos. Após a desinfecção em HCl (1%) os frutos foram inoculados com o fungo *B. cinerea* (10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) e passadas 96 horas foram avaliadas a área lesionada e a firmeza da polpa. Nos experimentos em pré-colheita foi observada indução de resistência à *B. cinerea* pelos eliciadores, inclusive com efeito de doses. No experimento 1, verificou-se maior atividade da FAL e maior acúmulo de fenóis totais, sendo estes parâmetros relacionados à redução da porcentagem de frutos podres e a menor incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma. Em pós-colheita, no experimento 3, houve redução de área lesionada por *B. cinera* mediante aplicação dos eliciadores. A atividade da fenilalanina amônia-liase aumentou em relação à testemunha e foi relacionada ao maior controle do mofo-cinzento, como também, à maior firmeza de polpa. No experimento 4, também houve a redução da área lesionada, bem como o aumento da firmeza de polpa com o aumento das doses de ambos os produtos. As doses 300 e



400 mg L<sup>-1</sup> de ProAct™ e Bion®, respectivamente, apresentaram os menores valores de área lesionada e a dosagem de 200 mg L<sup>-1</sup> de ambos os produtos apresentou maior firmeza de polpa.

**Palavras-chave:** eliciadores, *Botrytis cinerea*, *Fragaria x ananassa* Duch., Resistência Sistêmica Adquirida, Fenilalanina amônia-liase.

## ABSTRACT

TOMAZELI, Vanessa Nataline. Induction of resistance to diseases in strawberry with the use of acibenzolar-S-metil and harpin in pre and post harvest. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato branco, 2010.

The objective of this work was to evaluate the effects of elicitors acibenzolar-S-metil (ASM) and harpin protein in pre and post harvest in the induction of resistance against *Botrytis cinerea*, responsible to the gray-mold in strawberries, and about other infestant agents. Four experiments had been led, two of them in pre harvest, and other two in post harvest. The first experiment (1) in pre harvest, was carried out in a greenhouse. It was tested two products from harpin protein (ProAct™ 2,5 g L<sup>-1</sup> with 1% of i.a, and Messenger® 0,75 g L<sup>-1</sup> with 3% of i.a) and one from ASM (0,5 Bion® 500WG g L<sup>-1</sup> with 50% of i.a), more the control (distilled water). 24 hours after the second spraying of the treatments was carried through inoculation of *B. cinerea* (10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). To this experiment we had also been evaluated: productivity, incidence and severity of the one leaf blight fungus (*Dendrophoma obscurans*), percentage of aborted flowers, incidence of mites and percentage of fruits with the gray-mold, beyond the content of total proteins, activity of the phenylalanine ammonia-lyase enzyme (PAL), total phenols and the CO<sub>2</sub> assimilation rate. In the second experiment (2) in pre harvest, doses of harpin (ProAct™ 100, 200 and 300 mg L<sup>-1</sup>) and of ASM had been tested (Bion® 500 WG 100, 200, 300 and 400 mg L<sup>-1</sup>), more the control (distilled water). 24 hours after the first application of the treatments inoculation of *B. cinerea* (10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) was carried through. In this experiment evaluations for the productivity parameters, percentage of putrid fruits and the CO<sub>2</sub> assimilation rate had been carried through. Besides that, after the fourth application of the treatments, had been collected fruits for one of the experiments (4) in post harvest. Two experiments had been led more, in post harvest, the third experiment (3) was led in subdivided parts, with and without wounds in the fruits. The fruits had been sprayed with acibenzolar-S-metil (Actigar® 50WG 5.0 mg of i.a. mL<sup>-1</sup>), two commercial products having harpin protein (80 mg of i.a. L<sup>-1</sup> - ProAct™ e Messenger®) and one control (distilled water). The fruits of experiment 4 had been harvested of experiment 2, after the fourth application of the treatments. To the fourth experiment (4), fruits in pre harvest with 100, 200 and 300 mg L<sup>-1</sup> ProAct™ (1% of harpin), and 100, 200, 300 and 400 mg L<sup>-1</sup> of Bion® (50% of ASM), more the control (distilled water), were evaluated in post harvest. In experiment 3, the treatments had been applied by means of spraying and 12 hours after the *B. cinerea* fungus was inoculated (10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>). After 48 hours of the inoculation the fruits had been evaluated as for the injured area and pulp firmness. Sample of the vegetal material was collected for analysis of the total proteins content and the activity of the PAL. After the disinfection in HCl (1%) the fruits had been inoculated with *B. cinerea* fungus (10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) and passed 96 hours had been evaluated the injured area and the firmness of the pulp. In the experiments in pre harvest the induction of resistance against *B. cinerea* was observed by the use of elicitors, including with effect of doses. In experiment 1, it was verified bigger activity of the PAL and bigger accumulation of total phenols, being these parameters related to the reduction of the

percentage of rotten fruits and the smaller incidence and severity of the one leaf blight. In post harvest, in the experiment 3, there was reduction of injured area by *B. cinerea* through the application of the elicitors. Plants sprayed with the elicitors increased the activity of phenylalanine ammonia-lyase and it was related to the biggest control of the gray mold, as well as, the biggest pulp firmness. In experiment 4, there was also had the reduction of the injured area, as well as the increase of the pulp firmness with the increase of the doses of both the products. The doses of 300 and 400 mg L<sup>-1</sup> of ProAct<sup>TM</sup> and Bion<sup>®</sup>, respectively, had presented the smaller values of injured area, and the dosage of 200 mg L<sup>-1</sup> of both the products presented greater pulp firmness.

**Key word:** Elicitors, *Botrytis cinerea*, *Fragaria x ananassa* Duch., Systemic Acquired Resistance, Phenylalanine Ammonia-Lyase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Condução dos experimentos em casa de vegetação (A) e em estufa (B). UTFPR, 2009.....41
- Figura 02** – Folhas com sintomas da mancha-de-dendrofoma (A). Fruto com sintoma característico do mofo-cinzento (B). UTFPR, 2009.....43
- Figura 03** – Avaliação das trocas gasosas das plantas de morango através do analisador portátil de CO<sub>2</sub> a infra-vermelho (IRGA). UTFPR, 2009.....44
- Figura 04** – Curva de progresso da incidência da mancha-de-dendrofoma em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.....50
- Figura 05** – Curva de progresso da severidade da mancha-de-dendrofoma em morango, cultivar Camarosa tratado Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.....51
- Figura 06** - Incidência de ácaro e fotossíntese em plantas de morango, cultivar Camarosa, tratadas com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup> (A). Percentual de flores abortadas, frutos podres e número de frutos comercializáveis (NFC) em morango, cultivar Camarosa, tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup> (B). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas ou nas colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. UTFPR 2009.....53
- Figura 07** - Conteúdo de proteínas totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 8,8. UTFPR, 2009.....55
- Figura 08** – Conteúdo de proteínas totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 12,4. UTFPR, 2009.....56
- Figura 09** – Atividade da FAL 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 19,8. UTFPR, 2009.....57
- Figura 10** – Atividade da FAL 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 13,2. UTFPR, 2009.....58
- Figura 11** – Conteúdo de fenóis totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>™</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 8,6. UTFPR, 2009...60

- Figura 12** – Conteúdo de fenóis totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct™, Messenger® e Bion®. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 12,5. UTFPR, 2009.....61
- Figura 13** – Incidência de frutos podres em morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™ - Regressão significativa pelo teste F 5% para equação quadrática com CV%=9,1) e ASM (Bion® - Regressão significativa pelo teste F 5% para equação linear com CV%=22,9). UTFPR, 2009.....64
- Figura 14** – Condução dos experimentos 1 (A) e 2 (B) em pós-colheita. UTFPR, 2008/2009.....69
- Figura 15** – Incidência de podridões em frutos de morango tratados com Actigard® (A), ProAct™ (B) e Messenger® (C), comparados à Testemunha (D). UTFPR, 2008.....71
- Figura 16** - Área lesionada por *Botrytis cinerea*; firmeza de polpa (N) e atividade enzimática da FAL em frutos de morango, cultivar Camarosa, tratados com Messenger®, ProAct™ e Actigard® (A). Área lesionada por *B. cinerea* e firmeza de polpa (N) em frutos de morango com e sem fermento (B). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). UTFPR, 2008.....72
- Figura 17** - Incidência de podridões em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com ASM (Bion® - Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação linear com CV%=25) e harpina (ProAct™ - Regressão não significativa pelo teste F5% com CV%=28,2). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.....76
- Figura 18** - Área lesionada por *B. cinerea* em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™) e ASM (Bion®). Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação quadrática para ambos os produtos (CV%=23,6 Bion® e CV%=8,2 ProAct™). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.....76
- Figura 19** - Firmeza de polpa (N) em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™) e ASM (Bion®). Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação quadrática para ambos os produtos (CV%=14,8 Bion® e CV%=14 ProAct™). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.....78

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha-de-dendrofoma. Porcentagem de plantas com ácaros. Porcentagem de flores abortadas (FA) e porcentagem de frutos podres (FP) por *Botrytis cinerea*, em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.....47
- Tabela 02** - Número de frutos comercializáveis por planta (NFC), massa dos frutos comercializáveis por planta (MFC), massa média dos frutos comercializáveis (MMC) e fotossíntese (FT), em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.....52
- Tabela 03** - Número de frutos comercializáveis por planta (NFC), massa dos frutos comercializáveis por planta (MFC), massa média dos frutos comercializáveis (MMC) e sobre a incidência de frutos podres (FP), em morango, cultivar Aromas tratado com ProAct<sup>™</sup> e Bion<sup>®</sup>. UTFPR, 2009.....62
- Tabela 04** - Fotossíntese 24 horas antes e 24 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos (FT) e massa média de frutos comercializáveis por tratamento (MMF), em morango, cultivar Aromas tratado com ProAct<sup>™</sup> e Bion<sup>®</sup>. UTFPR, 2009.....63
- Tabela 05** - Área lesionada por *Botrytis cinerea* em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa tratados, em pós-colheita, com Actigard<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup> e inoculados com *B. cinerea*. UTFPR, 2008.....71
- Tabela 06** - Firmeza de polpa e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa tratados, em pós-colheita, com Actigard<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup> e inoculados com *Botrytis cinerea*. UTFPR, 2008.....74
- Tabela 07** - Área lesionada por *Botrytis cinerea*, eficiência de controle e firmeza de polpa em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Aromas tratados, em pré-colheita, com diferentes doses de Bion<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup> e inoculados com *B. cinerea*. UTFPR, 2009.....77

## LISTA DE ABREVIATURAS

1-MCP	1-Metil-ciclopropeno
ABA	Ácido Abscísico
AJ	Ácido Jasmônico
AS	Ácido Salicílico
ASM	Acibenzolar-S-metil
BDA	Batata-dextrose-ágar
DAP	Dias Após o Plantio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Etileno
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FI	Fotoperíodo Indutivo
FP	Frutos Podres
FT	Fotossíntese
IRGA	Analisador portátil de CO <sup>2</sup> a infra-vermelho
MET	Máxima Eficiência Técnica
MFC	Massa dos Frutos Comercializáveis
MFT	Peso dos Frutos por Tratamento
MMC	Massa Médio de frutos Comercializáveis
MJ	Metil Jasmonato
N	Newtons
NFC	Número de Frutos Comercializáveis
<i>PAL1</i>	Gene que codifica a FAL
<i>POX</i>	Gene que codifica a peroxidase ácida
Proteínas RP	Proteínas Relacionadas a Patogênese
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RSI	Resistência Sistêmica Induzida
T°	Temperatura
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO.....	19
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	20
2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO MORANGUEIRO.....	21
2.3.1 Mancha-de-dendrofoma ( <i>Dendrophoma obscurans</i> ).....	23
2.3.2 Mofo-cinzento ( <i>Botrytis cinerea</i> ).....	23
2.3.3 Podridão de Rhizopus ( <i>Rhizopus stolonifer</i> Ehr.).....	24
2.3.4 Implicações do Uso de Agrotóxicos.....	24
2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	25
2.4.1 Defesa Constitutiva.....	26
2.4.2 Defesa Pré-condicionada.....	28
2.4.3 Indução de Resistência a Patógenos e Insetos.....	30
2.4.4 Metabólitos Secundários e Fenilalanina Amônia-liase (EC 4.3.1.24).....	33
2.4.5 Harpina e a Defesa Vegetal.....	36
2.4.6 Acilbenzolar-S-metil e a Defesa Vegetal.....	37
<b>3 CAPÍTULO I – ELICIADORES EM PRÉ-COLHEITA</b> .....	39
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.2.1 Experimento 1.....	41
3.2.1.1 Condução das plantas.....	41
3.2.1.2 Tratamentos.....	42
3.2.1.3 Avaliações.....	43
3.2.2 Experimento 2.....	45
3.2.2.1 Condução das plantas.....	45
3.2.2.2 Avaliações.....	46
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.4 CONCLUSÕES.....	65
<b>4 CAPÍTULO II – ELICIADORES EM PÓS-COLHEITA</b> .....	66
4.1 INTRODUÇÃO.....	66
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.4 CONCLUSÕES.....	79
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	81
<b>ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS</b> .....	97
<b>APÊNDICES</b> .....	98
<b>ANEXOS</b> .....	102



## 1 INTRODUÇÃO

O mercado consumidor mundial tem aumentado as exigências quanto à qualidade dos frutos consumidos *in natura*, impondo aos produtores rigorosos procedimentos fitossanitários e, devido à conscientização dos consumidores brasileiros quanto à qualidade nutracêutica das pequenas frutas, como é o caso do morango, essas exigências têm se refletido também no mercado consumidor interno. Dessa forma, o produtor rural deve priorizar, em seu sistema de produção, alternativas biorracionais de controle de pragas e doenças, com o principal objetivo de reduzir o uso de agrotóxicos (MATTOS, 2004).

O morango tem recebido especial atenção, por apresentar elevados índices de resíduos de agrotóxicos (CALEGARIO, 2006). Segundo Madail et al. (2007), devido ao aumento na demanda por alimentos saudáveis e livres de agrotóxicos, os sistemas de produção integrada de morangos apontam índices de rentabilidade com boas perspectivas de exploração pelos produtores.

As doenças das plantas são consideradas um dos principais entraves à produção agrícola, ocasionando perdas econômicas significativas, desde o cultivo até a pós-colheita, com demanda extremamente grande por fungicidas, que, além dos problemas quanto à presença de resíduos, também tornam o processo produtivo mais oneroso.

As tecnologias de que os produtores podem lançar mão para atender as exigências de mercado são muitas e estão disponíveis e passíveis de serem utilizadas, desde que adequadamente estudadas, nas diversas cadeias produtivas. O uso de produtos de baixa carência e/ou residuais tem grande potencial e vai ao encontro de sistemas produtivos adequados a novos nichos de comercialização, reduzindo ou até mesmo eliminando os efeitos negativos do uso de agrotóxicos. Os chamados indutores de resistência ou eliciadores estão incluídos nesta linha de produtos de baixo impacto.

Diversos produtos podem ser citados como indutores de resistência ou eliciadores, os quais agem estimulando a produção de compostos do metabolismo secundário e proteínas relacionadas à patogênese, responsáveis pela defesa natural dos vegetais, não só com relação aos patógenos, como também aos insetos. Podem ser relacionados como produtos de ação indutora a proteína harpina e o acibenzolar-S-metil (DURRANT; DONG, 2004).

O potencial de utilização de eliciadores em pré e pós-colheita de frutos é muito promissor na busca de produtos de melhor qualidade. Porém, devido à grande diversidade biológica de que a natureza dispõe, é necessário se conhecer melhor a resposta das plantas a

esses indutores na cultura do morango e seus patossistemas, para que se possa indicar ou não o uso de um ou outro indutor de resistência. Além disso, poucos produtos desse gênero são hoje registrados no país. Os que existem são para um número reduzido de culturas. Com base no exposto acima, considera-se de grande relevância o estudo científico dos indutores de resistência, como forma de contribuir com o desenvolvimento de tecnologias mais seguras e menos tóxicas para o controle das doenças do morango.

Nesse contexto surgem alguns questionamentos: o uso dos eliciadores é realmente eficiente na indução da resistência sistêmica adquirida em morango? há supressão das doenças do morangueiro com o uso dos eliciadores? qual a influência sobre a produtividade de frutos de morango com o uso de eliciadores? quais mecanismos e compostos do metabolismo primário ou secundário estariam envolvidos na indução da resistência sistêmica adquirida, caso esta seja constatada?

Para responder a essas questões o presente estudo objetivou testar a proteína harpina e o acibenzolar-S-metil aplicados nas plantas em pré-colheita, e nos frutos em pós-colheita das cultivares Camarosa e Aromas (*Fragaria x ananassa* Duch.), quanto ao controle de doenças, bem como quanto às alterações bioquímicas e produtividade dos frutos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DO MORANGO

O morango é uma planta herbácea, pertence ao gênero *Fragaria* da família das Rosáceas. A maioria das variedades cultivadas advém da espécie *Fragaria x ananassa* Duch., hibridizada naturalmente pelo cruzamento das espécies octaplóides *F. chiloensis* e *F. virginiana*, originárias da América. O pseudofruto é constituído por um receptáculo carnudo onde se inserem os frutos verdadeiros conhecidos por aquênios. Sua polinização é alógama e entomófila e a má polinização pode incorrer em frutos deformados (ALMEIDA, 2006). O uso de polinizadores, como *Apis mellifera*, em ambiente protegido reduz de forma expressiva a ocorrência de frutos anormais e aumenta a proporção de frutos comercializáveis (ANTUNES et al., 2007; CALVETE et al., 2007).

A polinização e a fecundação dos frutos são prejudicadas também por temperaturas inferiores a 12 °C, embora as plantas em estágio vegetativo resistam muito bem a geadas e temperaturas de até - 15 °C. Diferentes variedades podem exigir entre 250 a 2000 horas de frio abaixo de 7 °C para retomar o crescimento vegetativo e o desenvolvimento floral (ALMEIDA, 2006).

Em geral, as cultivares de morango são classificadas de acordo com o fotoperíodo em cultivares de dias longos (indução floral com fotoperíodo indutivo/FI > 14 horas), cultivares de dias curtos (indução floral com FI < 12 horas) e cultivares insensíveis ao fotoperíodo ou de dias neutros (Indução floral inibida em T<sup>o</sup> > 30 °C) (ALMEIDA, 2006). O plantio do morango é recomendado entre os meses de março a maio para as variedades de dias curtos, dependentes do fotoperíodo e da temperatura para iniciar a fase reprodutiva. Entretanto, com o uso de novas variedades de dias neutros, há uma tendência em aumentar o período de produção, pela possibilidade de realizar o plantio no período de primavera, estendendo a produção durante o verão (OTTO et al., 2009).

Cerca de 80% das mudas de morango cultivadas no Rio Grande do Sul são importadas do Chile e Argentina, devido à baixa produtividade apresentada pelas mudas brasileiras (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2006). A melhor produtividade apresentada pelas mudas chilenas é relacionada ao maior número de horas de frio acumulado em mudas produzidas sob latitudes maiores, como é o caso do Chile e Argentina (OLIVEIRA; SCIVITTARO; FERREIRA, 2007).

A época de colheita para cultivares de dias curtos concentra-se nos meses de julho a setembro (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009), e estende-se entre os meses de setembro a dezembro (CANSIAN et al., 2002). Para estas, o potencial produtivo na região sul é de aproximadamente 35 ton ha<sup>-1</sup> (CANSIAN et al., 2002; OTTO et al., 2009), o que corresponde a aproximadamente 0,5 kg planta<sup>-1</sup> (CANSIAN et al., 2002). Para a cultivar de dias curtos Camarosa, na região Sul-Brasileira, produtividades variando de 0,35 kg planta<sup>-1</sup> (Chapecó-SC), 0,4 kg planta<sup>-1</sup> (Erechim-RS) a 1 kg planta<sup>-1</sup> (Pelotas-RS e Passos Fundo-RS) podem ser encontradas (CANSIAN et al., 2002; CALVETE et al., 2007; OLIVEIRA; SCIVITTARO; FERREIRA, 2007; VERONA et al., 2007). Para a cultivar Aromas podem ser observadas produtividades em torno de 0,21 kg planta<sup>-1</sup> em sistema de cultivo orgânico (VERONA et al., 2007) a 0,8 kg planta<sup>-1</sup> em cultivo protegido (CALVETE et al., 2007). A cultivar Camarosa é a mais plantada no Rio Grande do Sul e foi desenvolvida pela Universidade da Califórnia, Estados Unidos da América (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005).

O estande de plantas varia, usualmente, entre 55 a 74 mil plantas ha<sup>-1</sup> em canteiros com aproximadamente 1 m de largura e passagens de 0,5 m, onde o espaçamento mais utilizado é o de 30 x 30 cm, com coberturas de solo variadas, com diferentes plásticos ou materiais orgânicos (GROPPO; TESSARIOLI NETO; BLANCO, 1997).

## 2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A produção mundial de morango vem crescendo nos últimos anos, e apresentou um incremento de 29% no período de 1997 a 2006, com uma produção estimada em 3.908.975 toneladas numa área de 262.165 hectares em 2006. Os Estados Unidos lideram a produção de morangos com 28% do total mundial, sendo também os maiores consumidores (FAO, 2008).

A produção brasileira de morango é de aproximadamente 100.000 toneladas anuais, distribuídas em aproximadamente 3.500 hectares (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007). Praticamente, a totalidade da produção brasileira é destinada ao mercado interno, sendo que 70% desta é destinada ao consumo *in natura* (MADAIL et al., 2007). No Brasil, a produção de morango ocorre de maneira expressiva nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Distrito Federal (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009) e, embora seja pequena se comparada a outros países, encontra-se em expansão devido ao clima favorável e alta rentabilidade. O estado de

Minas Gerais é o maior produtor, responsável por 33% da produção nacional e o estado do Paraná na posição de quarto colocado contribui com 9% da produção brasileira (SPECHT; BLUME, 2009).

No estado do Paraná os principais pólos produtivos são os municípios de Maringá, Ponta Grossa, Cascavel, Londrina, Francisco Beltrão, Campo Mourão e Umuarama (ARKATEN, 2010). A produtividade média paranaense é de 25,2 ton/ha, e a produção é destinada ao consumo *in natura* e industrialização (DIAS, 2007).

O morango pode ser enquadrado no grupo das pequenas frutas, as quais têm possibilidade de alto retorno econômico em pequenas áreas e em curto espaço de tempo (PAGOT; HOFFMANN, 2006). Dessa forma, o cultivo do morango é considerado promissor e crescente devido a sua alta rentabilidade e sua importância social, pois exige elevado contingente de mão-de-obra (ANTUNES, 2006). Na região de Guarapuava/PR, a cultura foi considerada altamente rentável em estudo econômico para o cultivo do morango, sendo os riscos de produção considerados baixos para o cultivo em tunel e estufa (THIMÓTEO et al., 2010). No município de Jandaia do Sul/PR o sistema de cultivo orgânico tem apresentado resultados satisfatórios, agregação de valor ao produto e redução no custo de produção do morango, proporcionando maior rentabilidade (WITTMAN, 2009).

### 2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO MORANGO E CONTROLE

O morango é suscetível a uma série de doenças fúngicas, bacterioses e viroses que podem ocasionar grandes perdas de produtividade. As perdas pós-colheita também são significativas, sendo estas provocadas por diversas injúrias, desde ferimentos durante o processo de transporte e manuseio, até podridões pós-colheita. As podridões pós-colheita são de grande importância econômica, pois tornam os frutos inapropriados à comercialização.

Dentre as doenças relacionadas ao morango em pré e pós-colheita, a principal é o mofo cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinera*, caracterizado por formar uma massa cinzenta sobre os frutos, tornando-os inapropriados ao consumo. Esta doença é favorecida em condições de alta umidade relativa do ar (COSTA; VENTURA, 2006). Além disso, fungos do gênero *Colletotrichum* também têm apresentado danos no campo, atingindo órgãos da planta, tais como estolões e folhas (*Colletotrichum fragariae*), caracterizando a antracnose, e flores, causando a doença conhecida como flor-preta (*Colletotrichum acutatum*) (TANAKA;

PASSOS, 2002). Os fungos do gênero *Colletotrichum* esporulam abundantemente nas lesões produzindo grande quantidade de inóculo, facilitando assim sua disseminação. Os sintomas da antracnose caracterizam-se pela necrose de pistilos e estames florais, com início nos pedúnculos e partindo para cálice, flores e botões. Nas folhas aparecem manchas de formas irregulares de coloração marrom-escuro com início nos bordos ou ápice e espalhando-se para o centro. Nos frutos aparecem lesões arredondadas e deprimidas, com coloração castanha e de consistência firme (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). Em testes com diversos fungicidas para o controle da antracnose em morangueiro foi constatado que o uso isolado dos mesmos como forma de controle pode não ser eficiente, em função da alta incidência observada nas plantas tratadas (KOSOSKI et al., 2001).

Dentre as manchas foliares a principal delas é a mancha de micosferela, causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*, fase sexual do ascomiceto *Ramularia tulasnei*, cujos sintomas são manchas arredondadas sobre o limbo foliar, de coloração púrpura, com centro necrosado, em estágio avançado podem inutilizar a folha e avançar para pecíolos, cabos de frutos, cálices florais e estolões. As condições ótimas de desenvolvimento deste fungo são as mesmas exigidas pela cultura do morangueiro (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). Segundo mesmo autor, as medidas de controle comumente indicadas são o uso de variedades resistentes, bem como aplicações de fungicidas.

Outra doença comum em morangueiro é a mancha de diplocarpon causada pelo fungo *Diplocarpon earliana* um ascomiceto que na fase sexual corresponde a *Marsonina fragariae* e muitas vezes confundida com a mancha de micosferela. É caracterizada por manchas irregulares de cor púrpura homogênea sem o centro cinza como ocorre na mancha de micosferela e geralmente atinge as folhas mais velhas. Temperaturas entre 20 e 25°C favorecem a doença. O controle é o mesmo recomendado para mancha de micosferela (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005).

Além disso, pode-se citar a murcha de verticillium (*Verticillium albo-atrum*), a podridão da coroa e dos brotos (*Rhizoctonia solani*), a podridão de phytophthora (*Phytophthora cactorum*), podridões de raízes causadas por vários patógenos, as viroses como a clorose marginal (Strawberry mild yellow edge virus - SMYEV), o encrespamento (Strawberry crinkle vírus - SCV), o mosqueado (vírus do mosqueado), a faixa das nervuras (Strawberry vein bandingvirus - SVBV), ilarvirus em morangueiro (Tobacco streak vírus - TSV) e dentre as bacterioses a mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005).

### 2.3.1 Mancha-de-dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*)

A mancha-de-dendrofoma é de pouca importância econômica, pois ataca folhas velhas após a colheita dos frutos (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). Entretanto, quando ocorre em alta intensidade, favorecida por temperaturas elevadas, torna-se importante por reduzir severamente a área fotossinteticamente ativa (TANAKA, 2002). A sintomatologia é observada na forma de manchas necróticas em formato de V, resultado do crescimento ao longo das nervuras; apresentam coloração vermelho-púrpura inicialmente e evoluem para marrom-escuro, onde crescem picnídios negros e globosos e no interior destes encontram-se os conídios (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005).

O inóculo permanece de um cultivo para outro na forma de lesões foliares (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). A proporção de folhas de morango tomadas pela mancha-de-dendrofoma aumenta à medida que o cultivo ultrapassa o inverno e segue a primavera, de acordo com o aumento das temperaturas (VERONA et al., 2007).

### 2.3.2 Mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*)

O fungo *B. cinerea* possui um amplo espectro de ação, atingindo diversas espécies e diferentes estruturas vegetais. Essa capacidade lhe é conferida devido à presença de algumas importantes enzimas que atuam na degradação da parede celular vegetal como pectinases e celulases (PERKOVSKAYA et al., 2004).

O sintoma mais visível ocorre nos frutos mumificados com espessa massa micelial de coloração acinzentada. O fungo é extremamente favorecido por alta umidade e temperatura entre 18° e 20°C, com dispersão promovida pelo vento e respingos de gotas de água (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005). O fungo pode ainda permanecer estável nas pétalas de flores causando posterior infecção dos frutos (BOFF et al., 2003). Para o controle é importante o uso de mudas sadias e redução de fontes de inóculo (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005), procedendo-se à retirada de folhas velhas, doentes e secas; além disso, espaçamentos adensados, excesso de adubação nitrogenada e irrigação por aspersão são fatores agravantes; por outro lado, a adubação com cálcio pode reduzir a severidade (COSTA; VENTURA, 2006).

### 2.3.3 Podridão de *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer* Ehr.)

A podridão de *Rhizopus*, causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* Ehr., é a principal doença pós-colheita do morango, embora raramente observada no campo. Sob alta umidade as lesões ficam recobertas por denso micélio branco entremeado com esporangióforos e esporângios escuros do fungo. O fungo penetra nos frutos por meio de lesões existentes e seus esporos são disseminados com facilidade pelo ar. As temperaturas inferiores a 6°C inibem a germinação dos esporos (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005).

Para o controle desta enfermidade recomendam-se alguns tratamentos culturais, como a cobertura do solo com filme plástico evitando o contato dos frutos com o mesmo, evitar condições de alta umidade, colher os frutos em períodos do dia mais secos e evitar ferimentos nos frutos. A aplicação de fungidas é recomendada desde que sejam respeitados o período de carência e o nível de toxicidade do produto (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005).

### 2.3.4 Implicações do Uso de Agrotóxicos

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e nesse contexto 20% do consumo de ingrediente ativo de fungicidas é destinado ao cultivo de hortaliças, o que expõe o consumidor, o ambiente e o trabalhador a contaminação química, sendo necessárias medidas que visem a oferta de alimentos não apenas em quantidade ou variedade, mas também no tocante a qualidade, uma vez que a segurança alimentar deve ter como base o consumo de alimentos promotores da saúde (ALMEIDA; CARNEIRO; VILELA, 2009).

Neste contexto, as doenças anteriormente citadas para cultura do morango são, normalmente, controladas por fungicidas, dentre os quais, produtos cúpricos que deixam os frutos com aspecto inapropriado à comercialização e que, além da toxicidade, deixam resíduos (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005), apresentando, ainda, certo efeito sobre organismos benéficos como abelhas, que são importantes para a polinização e conseqüente produção. Além disso, o morango é citado, pela ANVISA, entre as culturas com maiores irregularidades quanto ao uso de agrotóxicos (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009).



No relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos no estado do Paraná para cultura do morango foi constatada a presença de agrotóxicos em todas as amostras avaliadas e 28,6% dessas foram consideradas insatisfatórias. Durante os sete anos de monitoramento deste programa a cultura do morango apresentou percentual de amostras insatisfatórias variando de 28,6 a 89,9%, sendo ainda detectada a presença de agrotóxicos não permitidos para cultura do morango como o metamidofós, o qual apresenta alta toxicidade aguda e neurotoxicidade (SESA, 2009).

Além dos graves problemas para saúde humana e para o meio ambiente, o uso contínuo do mesmo princípio ativo ou princípios ativos com mecanismos de ação fúngica relativos pode ocasionar a resistência das doenças aos mesmos, resultado de uma ou mais modificações na constituição genética do patógeno, uma vez que mutações espontâneas ocorrem constantemente e quanto maior for a frequência do tratamento com o princípio ativo maior será o acúmulo de indivíduos resistentes (BRENT, 1999). Em morango, segundo Tanaka, Passos e Betty (1997), vários isolados de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* tem apresentado resistência ao benomyl, considerado um dos principais fungicidas utilizados na cultura.

## 2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As plantas apresentam defesas naturais contra patógenos ou pragas, presentes nas mesmas antes do aparecimento destes agentes. Entretanto, existem outros sistemas de proteção ativados mediante tais ataques, denominados Resistência Sistêmica Adquirida ou Induzida, os quais são responsáveis pela defesa contra patógenos e insetos. Em geral, o que ocorre é que ao ser infectada a planta ativa seus mecanismos de defesa (STICHER; MAUCHMANI; MÉTRAUX, 1997). Dessa forma, ao ser atacada, ativa-se na planta uma série de genes relacionados à defesa vegetal, responsáveis pela produção de compostos antimicrobianos, bem como ativadores de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), além de respostas de hipersensibilidade (DURRANT; DONG, 2004).

Os indutores de resistência em vegetais podem ser classificados em bióticos e abióticos, de acordo com seu modo de ação indutora. Indutores bióticos são organismos vivos, ou partes dos mesmos, que desencadeiam processos de defesa, com ação sistêmica ou localizada nos vegetais. Os indutores abióticos podem ser moléculas sintéticas que mimetizam

o sinal do patógeno, ativando genes relacionados à defesa, aumento na produção de metabólitos secundários como compostos fenólicos, fitoalexinas e o ácido salicílico, ou ainda ferimentos, estresses por temperatura, radiação UV ou salinidade (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005). Dentre os indutores bióticos, podem-se citar a proteína harpina (QUI; CLAYTON, 2002a; DANNER et al., 2008), a quitosana (HAHN, 1996; MAZARO et al., 2008), os extratos vegetais e/ou microbianos (SANTOS et al., 2007; SILVA; PASCHOALATI; BEDENDO, 2007; YESIL-CELIK TAS et al., 2007); dentre os abióticos, o acibenzolar-S-metil (ASM) (SILVA; PASCHOALATI; BEDENDO, 2007; DANNER et al., 2008; MAZARO et al., 2008), kaolin (TUBAJIKA et al., 2007), o silicato de potássio (CARRÉ-MISSIO et al., 2006), e o oxiclóreto nítrico (DIAS; RANGEL, 2007). Alguns desses eliciadores mimetiza o ataque de fitopatógenos, e dessa forma desencadeiam uma cascata de sinais para indução de defesa (ZHANG et al., 2004).

#### 2.4.1 Defesa Constitutiva

A defesa constitutiva é determinada pela genética da planta presente na mesma independente de situações de estresse, herbivoria ou patogenicidade. Esse mecanismo de defesa é caracterizado pelo teor de substâncias tóxicas sintetizadas pela planta como os taninos, furanocumarinas, saponinas, glicosídeos cianogênicos, ácido cianídrico e xantotoxinas presentes em diferentes plantas com ação tóxica para diversos gêneros de herbívoros (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Diversos compostos de plantas têm atividade tóxica sobre herbívoros ou patógenos; muitos deles, por si sós, são menos efetivos; porém, misturados, como os muitos terpenos e alcalóides constituintes de óleos essenciais, tornam-se sinérgicos e efetivamente venenosos (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Essas toxinas podem ser danosas para a própria planta, porém, esta é capaz de sintetizá-las e armazená-las em locais isolados dentro da célula sem provocar danos a si mesma (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). Muitos desses compostos e óleos essenciais são armazenados em glândulas capitatas ou tricômas como, por exemplo, em *Artemisia annua* (MARCHESE, 2006), ou ainda, podem ser armazenados na forma de compostos pré-formados, isolados das enzimas que os catalisam para formas tóxicas. Dessa forma, quando a planta é ferida, a enzima e seu substrato entram em contato, concluindo o processo de

hidrólise e conferindo propriedades tóxicas à herbivoria (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Alguns compostos são armazenados em diferentes compartimentos e misturados mediante ferimentos provocados por herbivoria, como ácido cianídrico liberado em *Manihot esculenta* Crantz que após hidrólise de glicosídeos cianogênicos, é tóxico a diversos animais. Entretanto, a desidratação e a moagem das folhas promovem a volatilização desse composto podendo ser a planta fornecida como fonte de alimento (PENTEADO; FLORES, 2000) até mesmo como suplemento para abelhas (PEREIRA et al., 2007). Esse fato foi demonstrado em hipocótilos de *Phaseolus vulgaris* eliciados com glucana, em que, embora o acúmulo da fitoalexina faseolidina ocorra após a elicitación, foi demonstrado que este acúmulo ocorre mediante a quebra de um composto pré-formado, chamado de faseolidina glicosídeo, que é armazenado nesta forma conjugada em vacúolos celulares (SORIANO-RICHARDS; URIBE SALAS; IBARRA-BARRERA, 1998).

Em geral, esses compostos tóxicos são produtos do metabolismo secundário, e inúmeras plantas apresentam substâncias particulares ou comuns entre elas: as mais comuns são os alcalóides em geral, terpenos e compostos fenólicos como taninos, lignina e furanocumarinas (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; BENNET; WALLSGROVE, 1994; FACCHINI, 2001). Sugere-se, ainda, que após o ferimento ocorra uma desintoxicação das áreas próximas a ele pela produção e liberação de enzimas que promovem a hidrólise reversiva desses compostos para outros não tóxicos (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

Por outro lado, alguns organismos desenvolveram mecanismos específicos de desintoxicação para as toxinas vegetais, tornando-se especializados em determinados hospedeiros, como algumas lagartas de lepidópteros do gênero *Papilio* que são capazes de metabolizar as furanocumarinas presentes em Apiaceae e Rutaceae (MA et al., 1994), bem como fungos capazes de metabolizar as saponinas de seus hospedeiros (MORRISSEY; OSBOURN, 1999).

A defesa constitutiva foi essencial para a adaptação e sobrevivência dos vegetais, porém, este mecanismo possui o inconveniente de que no caso de a planta não ser atacada, a mesma demandou energia para manter os níveis das toxinas em suas estruturas (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002).

#### 2.4.2 Defesa Pré-condicionada

Além da defesa constitutiva, há outro mecanismo de defesa conhecido como defesa induzida ou indução de resistência, em que, a partir da infecção primária de determinado agente patogênico, a planta permanecerá pré-condicionada a posteriormente resistir ao ataque do mesmo ou de outros organismos, de maneira análoga ao sistema imunológico dos animais, embora por meio de mecanismos distintos (DURRANT; DONG, 2004). Agrega-se ao termo indução de resistência, o termo resistência sistêmica, pois a capacidade de defesa que é induzida não atua apenas no local de infecção, mas também em estruturas da planta distantes deste (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Há muitos relatos e controvérsias em relação a nomenclaturas e tipos de resistência induzida. Para Kúc (2001), Resistência Sistêmica Induzida (RSI) refere-se ao fenômeno de resistência a doenças sistemicamente induzidas por infecções localizadas ou tratamentos com componentes de microorganismos ou componentes orgânicos e inorgânicos diversos. Divididos de acordo com as respostas pertinentes em: (1) resistência passiva ou mediada por ferimento onde se têm como componentes responsáveis pela defesa a cutina, glicosídeos fenólicos, fenóis, quinonas, glicoalcalóides esteróis, suberina, terpenos e proteínas, e (2) resistência após a infecção, pela síntese de compostos como fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, cálcio, silicatos, peroxidases, proteínas antimicrobianas e peptídeos, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, ribonucleases, proteases, calose, lignina, lipoxigenases e fosfolipases. Ou seja, a RSI pode ser associada à resistência contra patógenos e insetos, uma vez que diferentes compostos metabólicos e rotas podem resultar em diferentes respostas bioquímicas.

Hammerschmidt (1999) subdivide a indução de resistência em duas categorias: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), desenvolvida local ou sistemicamente em resposta a um patógeno e associada à produção de proteínas-RP mediada via ácido salicílico, podendo, ainda, ser induzida pela aplicação de compostos exógenos como ácido salicílico (AS) e acibenzolar-S-metílico (ASM); e Resistência Sistêmica Induzida (RSI), induzida sistemicamente por bactérias da rizosfera, sinalizadas por jasmonato/etileno e sem a produção de proteínas-RP. Essa mesma subdivisão é descrita por Sticher; Mauch-Mani; Métraux (1997). Para Walters (2009), a indução de resistência pode ser expressa localmente, ou de forma sistêmica e ainda dividida em três tipos: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA),

Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e resistência induzida por ferimento. Nesse contexto, a RSA ocorre em resposta a infecções patogênicas virulentas ou eliciadores que imitam o sinal patogênico incluindo substâncias químicas como ASM e é mediada pelo acúmulo de AS e expressão de genes relacionados à patogênese. Já RSI é resultado da colonização radicular por rizobactérias promotoras do crescimento mediadas pelo jasmonato e rotas sensíveis ao etileno, enquanto a resistência induzida por ferimento estaria vinculada a injúrias nos tecidos ocasionadas por insetos herbívoros. Por outro lado, Sticher, Mauch-Mani e Métraux (1997), comentam que danos em folhas ocasionados por insetos também podem induzir a RSA. Há ainda um tipo de resposta similar a RSA, porém, restrita ao local de infecção, conhecida como “Localized Acquired Resistance (LAR)” (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Mauch-mani e Métraux (1998) caracterizam a RSA como dependentes do acúmulo de ácido salicílico (AS) e da expressão de genes relacionados à patogênese, enquanto a RSI por rizobactérias independe desses fatores, concluindo que ambas são induzidas por diferentes rotas. Além disso, Métraux (2001) realaciona a RSI ao acúmulo e sinalização por ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) e comenta ainda que a terminologia correta deveria ser Resistência Induzida por Patógenos e Resistência Induzida por Rizobactérias.

Essas diferentes respostas podem ser mediadas por diferentes sinalizadores como ácido salicílico, ácido jasmônico (AJ), etileno (ET), ácido abscísico (ABA) e óxido nítrico, e muitos deles podem ser antagônicos, indicando uma capacidade da planta em, por exemplo, distinguir uma resposta por ferimento de uma resposta por patógeno (KÚC, 2001). É conhecido o efeito antagônico ente AS e AJ, onde o acúmulo de AS estimulado pela infecção por patógeno é relacionado à supressão do sinal por AJ na defesa contra insetos herbívoros (PIETERSE et al., 2005). Os mesmos autores comentam que ambas as formas de resistência RSI (promovida por rizobactérias) e RSA (promovida pela infecção patogênica), apresentam um amplo espectro de ação contra diversos fitopatógenos, sobrepondo-se parcialmente, mas também divergem, sugerindo que as respostas ativadas sejam diferentes. Os autores concluem ainda que as duas são reguladas por rotas metabólicas distintas, devido à RSA ser condicionada pelo acúmulo de AS o qual ativa o gene NPR1, responsável pela produção de proteínas-RP, e por este fenômeno não ser observado no caso da RSI que parece ser baseada num aumento de defesa dependente de AJ e ET.

Apesar dos muitos conceitos, é fato que o pré-tratamento com cepas avirulentas de determinados microorganismos promovem uma redução significativa nos sintomas de doenças causadas por patógenos altamente virulentos posteriormente inoculados, no que diz

respeito ao número e tamanho de lesões, indicando um marcante efeito relativo ao pré-condicionamento das plantas (KOMBRINK; SCHMELZER, 2001).

Apesar das vantagens da defesa induzida ou pré-condicionada no tocante aos custos energéticos, este mecanismo pode não ser eficiente em casos onde a planta é desafiada por patógenos altamente virulentos, não havendo tempo hábil para desencadear um processo de defesa (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; WALTERS, 2009), embora sabe-se que o acúmulo de substâncias envolvidas na indução de resistência é rápido (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; LAXALT; MUNNIK, 2002; ZHANG et al., 2004).

#### 2.4.3 Indução de Resistência a Patógenos e Insetos

A resistência contra patógenos a que se refere a RSA não surge simplesmente no momento da infecção, mas há sim a ativação de um mecanismo de defesa latente, no momento em que a planta é desafiada por um determinado microorganismo patogênico (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). O tempo demandado para a ativação da RSA mediante a sinalização varia de planta para planta e com o patógeno, sendo a duração efetiva da RSA e o número de microorganismos a que o vegetal torna-se resistente, bastante variáveis (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Na RSA, moléculas sinalizadoras dos agentes patogênicos ligam-se às moléculas receptoras desencadeando reações como resposta de hipersensibilidade (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; DURRANT; DONG, 2004); formação de calos, lignificação, acúmulo de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) (WARD et al., 1991; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997) como será descrito a seguir.

A reação de hipersensibilidade pertinente à RSA tem sido observada em diversos estudos (ZHANG et al., 2004; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; CHAERLE et al., 2007), nos quais observa-se, em resposta à infecção pelo patógeno, rápida morte de algumas células em volta do local do início da infecção, funcionando como uma barreira física contra o agente patogênico. Além disso, há nesses locais a secreção de substâncias sinalizadoras para indução de resistência (ZHANG et al., 2004) e produção de radicais livres fortemente envolvidos no processo de sinalização antes e depois da reação de hipersensibilidade (KOMBRINK; SCHMELZER, 2001). A típica reação de hipersensibilidade foi observada nas

interações cultura/patógeno como, por exemplo, em *Phaseolus vulgaris*/*Colletotricum lindemuthianum* e beterraba/*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)/ASM, com lesão superficial, isolada e limitada ao sítio de infecção (SORIANO-RICHARDS; URIBE SALAS; IBARRA-BARRERA, 1998; BURKETOVÁ; STILLEROVA; FELTLOVÁ, 2003).

A alta produção de radicais livres, que ocorre juntamente com a reação de hipersensibilidade, é conhecida por explosão oxidativa. A rápida morte celular é resultado da peroxidação de ácidos graxos e lipídios causando a degradação da membrana. Sugere-se que este processo seja autônomo para cada célula, indicado por um acúmulo intracelular desses radicais livres (KOMBRINK; SCHMELZER, 2001). Diferentes eliciadores extraídos de cultura filtrada de *B. cinerea* induziram o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura celular de alho já no primeiro minuto após a aplicação, sendo dependentes da dose, e essas EROs foram responsáveis pela sinalização para subsequente resposta de defesa, observada pela síntese de fitoalexinas que também foi dependente da dose (PERKOVSKAYA et al., 2004).

Outras formas de barreiras também são observadas após a infecção patogênica, como o caso da lignificação dos tecidos e formação de papilas e calose, que agem na resistência mecânica dos tecidos, impedindo a colonização patogênica, além de resistir melhor à degradação enzimática provocada pela secreção de enzimas de diversos fungos (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

O acúmulo de AS também pode ser observado após a infecção patogênica, este composto é conhecido por ativar sinais sistêmicos responsáveis pela RSA, sendo acumulado nas folhas e no floema desencadeando processos de defesa como a própria ativação da resposta de hipersensibilidade e acúmulo de EROs e síntese de outros compostos antimicrobianos ligados ao aumento da atividade da fenilalanina amônia liase (FAL) (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998; MÉTRAUX, 2001; DURRANT; DONG, 2004; GLAZEBROOK, 2005), conhecida como a enzima chave na biossíntese dos fenilpropanóides envolvidos na defesa (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

O acúmulo de AS foi observado em folhas de tabaco de uma variedade selvagem, após estas serem eliciadas com uma proteína isolada da secreção do fungo *Phytophthora boehmeriae*. Comparando esta variedade com uma variedade de tabaco mutante para o não acúmulo de AS, foi possível observar a expressão do gene PR-1a, que codifica uma proteína-RP, ao contrário da variedade mutante, concluindo que a resposta para RSA depende do acúmulo do AS (ZHANG et al., 2004). Pode ainda ocorrer sinalização de uma planta para

outra pela conversão do ácido salicílico em compostos voláteis como o metil salicilato (GLAZEBROOK, 2005).

Plantas pré-tratadas com AS apresentam maiores níveis de proteínas-RP antes da inoculação do patógeno e as reações como a lignificação da parede celular aparecem após a infecção patogênica, indicando que há um pré-condicionamento da planta para responder à infecção pela expressão de genes envolvidos na defesa como o *gene-FAL* (MÉTRAUX, 2001). A aplicação de ASM, molécula que mimetiza o AS, em plantas de pepino praticamente não apresentou efeitos sobre a expressão dos genes relacionados à patogênese para transcrição da peroxidase ácida (*POX*), gene homólogo para proteínas-RP (*PRI*) e do gene que codifica a FAL (*PALI*). Entretanto, a subsequente inoculação do patógeno virulento *Colletotricum orbiculare*, promoveu a expressão dos três genes em comparação ao controle sem a aplicação de ASM (COOLS; ISHII, 2002). Os genes relacionados à defesa somam em torno de 1% do total, esse número é muito inferior ao número de potenciais patógenos, o que significa que um gene pode ter múltiplas funções para defesa (MARTIN; BOGDANOVE; SESSA, 2003). Esse fato traz certa economia genômica e fisiológica às plantas, que são desafiadas por milhares de organismos patogênicos distintos (MARTIN; BOGDANOVE; SESSA, 2003).

No que se refere às proteínas-RP, estas são classificadas como proteínas não detectadas nos tecidos sadios e que são induzidas e incrementadas nos tecidos após infecção por um ou mais patógenos, porém, podem estar presentes em órgãos de reserva, como sementes, raízes e frutos, antes da infecção, conferindo proteção aos mesmos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases estão entre as proteínas-RP mais conhecidas. Elas atuam na degradação da quitina e glucana, respectivamente, presentes na parede celular de muitos fungos patogênicos, ou mesmo nematóides e insetos no caso das quitinases. Além disso, a combinação de ambas é muito mais efetiva na degradação da parede celular microbiana (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Mazaro (2007) observou, em morango, o aumento na atividade dessas enzimas após aplicação de quitosana e ASM, 120 h e 168 h após o tratamento, para quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, respectivamente. Em raízes de beterraba, Burketová; Stillerova; Feltlová (2003) também observaram acúmulo de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em tecidos infectados pelo vírus BNYVV, pelo seu vetor *Polimixia betae* e tecidos tratados com ASM, ao contrário do que foi observado em tecidos sadios, indicando que não se trata de um processo de defesa constitutiva. Além das enzimas referidas, algumas endoproteínases também podem atuar na degradação da parede celular de patógenos. As peroxidases podem atuar reforçando a parede celular vegetal catalizando a lignificação e



algumas proteínas com atividade de superóxido dismutase podem liberar o peróxido de hidrogênio, atuando como antimicrobiano e ainda podem sinalizar mecanismos de defesa (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Alguns processos de transdução de sinal para estas e outras respostas são sugeridos, dentre estes algumas enzimas que catalizam mensageiros secundários e podem ser apontadas como parte de rotas de transdução de sinais, como as fosfolipases (LAXALT; MUNNIK, 2002). Os fosfolípidios constituem a maioria dos componentes estruturais de membranas e sugere-se que também estejam envolvidos no processo de sinalização que nela inicia, quando a planta reconhece o patógeno e as moléculas derivadas deste ligam-se a receptores protéicos, ativando a sinalização que desencadeia o processo de defesa, resultando na expressão de genes que codificam proteínas-RP, fosfolipases, envolvidas na transdução de sinais secundários, e a FAL (LAXALT; MUNNIK, 2002).

As moléculas presentes nos microorganismos patogênicos que são reconhecidas pelos receptores são normalmente polissacarídeos, como as glucanas e quitosanas, polipeptídeos e glicoproteínas presentes na parede celular micelial, inclusive em algumas bactérias simbiontes como *Bradyrhizobium japonicum*. Para diferentes moléculas eliciadoras pode haver receptores específicos que garantem maior eficiência na defesa (HAHN, 1996), sendo esta vantagem seletiva o ponto chave da RSA na sobrevivência das plantas (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Além da defesa induzida contra patógenos, as plantas apresentam um tipo de defesa induzida contra insetos, em que a mesma reconhece substâncias eliciadoras presentes em sua saliva, ou mesmo liberadas no momento da oviposição, e ao ser elicitada por tais substâncias, a planta libera compostos voláteis capazes de atrair predadores inclusive para os ovos do inseto que a desafiou (KESSLER; BALDWIN, 2002).

#### 2.4.4 Metabólitos Secundários e Fenilalanina Amônia-liase (EC 4.3.1.24)

Na rota do ácido chiquímico são produzidos os aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). A enzima FAL atua sobre a fenilalanina removendo o grupamento amônia, convertendo-a para ácido cinâmico e a partir deste são formados diversos compostos fenólicos envolvidos em mecanismos de defesa, tais

como lignina, flavonóides (antocianinas), fitoalexinas e o ácido salicílico (EMILIANI et al., 2009; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

A atividade da FAL pode ser regulada por diversos fatores, e embora presente constitutivamente nos tecidos vegetais, é aumentada mediante a maioria das infecções (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Extratos de patógenos, como o fungo *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora cactorum*, usados como eliciadores, aumentam a atividade da FAL (ORSOMANDO et al., 2003; BROETTO et al., 2005). A alta concentração de ET nos tecidos promovida pela aplicação de ácido abscísico (ABA) aumenta a atividade da FAL em frutos de morango na pós-colheita, melhorando sua coloração pelo acúmulo de antocianinas (JIANG; JOYCE, 2003). Por outro lado, a baixa concentração do ET em atmosfera controlada com alta concentração de CO<sub>2</sub> não influencia na atividade desta enzima em frutos de cherimoya (ASSIS et al., 2001), assim como a aplicação do inibidor de etileno 1-metil-ciclopropeno (1-MCP) em frutos de pera em pós-colheita, reduz a atividade da FAL (MACLEAN et al., 2007). A FAL também responde a estresses originados pela radiação ultravioleta (UV), baixos níveis nutricionais (DIXON; PAIVA, 1995) e estresse hídrico (OH; TRICK; RAJASHEKAR, 2009).

Adaptações importantes ocorreram nas plantas primitivas para que estas sobrevivessem ao ambiente inóspito que era o planeta Terra. A chave para essas adaptações e para a formação dos nossos ecossistemas sofisticados foi o surgimento de vias metabólicas secundárias, dentre elas, a via dos fenilpropanóides ou compostos fenólicos, mediados pela FAL, foi fundamental (EMILIANI et al., 2009). Estes compostos já foram rotulados como lixo metabólico; entretanto, hoje são conhecidas funções de defesa das plantas contra salinidade, estresse hídrico, radiação UV, pragas e doenças, denominados compostos do metabolismo secundário (EMILIANI et al., 2009), como a lignina, furanocumarinas, fitoalexinas e o ácido salicílico, produtos da rota dos fenilpropanóides derivados da fenilalanina (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

A lignina é fundamental para vascularização do xilema e rigidez do caule (EMILIANI et al., 2009). Em cultura de calos de *Linun austriacum*, o uso dos eliciadores manana,  $\beta$ -1,3-glucano e ancimidol induziram rotas de biossíntese que promoveram o acúmulo de lignina (VARDAPETYAN et al., 2003), assim como os eliciadores quitosana e extrato micelial de *Fusarium* induziram ao acúmulo de lignina em raízes de tomateiro reforçando a parede celular, que foi relacionado ao aumento na atividade da FAL (MANDAL; MITRA, 2007).

As fitoalexinas são compostos do metabolismo secundário de baixo peso molecular envolvidos na defesa, com ação antimicrobiana, acumulados após a infecção ou eliciação

(HAMMERSCHIMIDT, 1999) e os flavonóides são importantes para a biologia reprodutiva, pois são as substâncias responsáveis pela coloração de flores e frutos fundamentais para atração de polinizadores e dispersores; além disso, conferem proteção contra os raios UV, uma vez que apresentam ação antioxidante (EMILIANI et al., 2009).

O processo metabólico responsável pela produção de energia celular, chamado de oxidação, também leva à produção de radicais livres. O excesso destes no organismo, conhecido por estresse oxidativo, é a causa de diversas doenças degenerativas em seres humanos, como o câncer (AMES; GOLD; WILET, 1995; ADEGOKE et al., 1998). Alguns polifenóis comuns, principalmente em vinhos tintos, são conhecidos pela capacidade antioxidante que trazem inúmeros benefícios à saúde humana, inclusive na prevenção e inibição de tumores (SOLEAS et al., 1997). O resveratrol é o mais conhecido dos polifenóis e sua concentração em vinhos oriundos de uvas vermelhas é significativamente superior àqueles oriundos de uvas brancas (SOLEAS et al., 1997). Alguns estudos têm demonstrado a capacidade antioxidativa do resveratrol (SHIGEMATSU et al., 2003; IACOPINI et al., 2008). As EROs estão normalmente envolvidas em injúrias renais. O resveratrol é capaz de reduzir estas EROs, como a peroxidação lipídica, promovendo a supressão do processo inflamatório (SOARES et al., 2007). Frutos nativos do bioma Cerrado também apresentam altos teores de compostos fenólicos e possuem excelente capacidade de sequestrar radicais livres (ROESLER et al., 2007). As frutas vermelhas, em geral, inclui-se aí o morango, são conhecidas pela atividade anticancerígena, devido à presença de flavonóides, principalmente a antocianina (WARGOVICH, 2006). Além do câncer, outras doenças de caráter degenerativo podem ser prevenidas pelo consumo de alimentos ricos em antocianinas, como catarata, glaucoma, retinopatia diabética e aterosclerose, atuando também no sistema nervoso, vasos e artérias (HENRIQUES et al., 2004). Extratos de frutos de diferentes cultivares de morango reduziram a proliferação celular em relação ao controle, e a maior atividade antioxidante ocorreu na cultivar Earliglow, a qual também apresentou o maior teor de fenóis totais (MEYERS et al., 2003). Esta cultivar também apresentou maior conteúdo de antocianinas e atividade antioxidante em estudo que testou diferentes espécies de frutas vermelhas e cultivares de morango, na qual também foi possível observar incremento no acúmulo de antocianina com a gradual maturação dos frutos (WANG; LIN, 2000).

Essas diferenças no conteúdo de antocianinas podem ser usadas na distinção de variedades de morango e na escolha de variedades em função do maior teor de antocianinas (CALVETE et al., 2008) e, ocasionalmente, maior capacidade antioxidante.

#### 2.4.5 Harpina e a Defesa Vegetal

A proteína harpina é de ocorrência natural em diversas bactérias de ação patogênica em plantas e foi, inicialmente, isolada da bactéria *Erwinia amylovora*. Esta proteína tem ação confirmada na indução à RSA, além de promover o acúmulo de biomassa na planta (WEI et al., 1992; LESTER; BUBENHEIM; ROCHER, 2002; QUI; CLAYTON, 2002a). A proteína harpina pode ser associada a diversos vegetais, com grande potencial na ativação de resistência sob diferentes aspectos e níveis de eficiência.

O produto comercial Messenger<sup>®</sup>, à base de proteína harpina, foi desenvolvido pela EDEN Bioscience, não é tóxico e degrada facilmente após a aplicação, sendo a harpina considerada indutor de resistência biótico, classificada como um isolado avirulento (ROCHER; BAUER; QUI, 2002; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002).

Os frutos, mesmo após a colheita, continuam com o metabolismo ativo e desta forma a aplicação de eliciadores pode ter efeito desejável no controle pós-colheita de patógenos. A aplicação pós-colheita de Messenger<sup>®</sup> inibiu o desenvolvimento de doenças e contribuiu para conservação dos frutos, inclusive de morangos (ROCHER; BAUER; QUI, 2002). Os tratamentos de cerejas em pré e pós-colheita reduziram a incidência de doenças de ocorrência natural comparado ao uso de Messenger<sup>®</sup> apenas em pré ou em pós-colheita, ou ao não uso do produto (QUI; CLAYTON, 2002b). Verificou-se um maior acúmulo de ácido salicílico com o uso do Messenger<sup>®</sup>, porém, este não é o único mecanismo de defesa desencadeado pelo produto, sendo o mesmo responsável pela ativação de outros mecanismos (HUTCHEON; ROCHER; QUI, 2002). Segundo Rocher, Bauer e Qui (2002), para framboesa, o tratamento com Messenger<sup>®</sup>, comparado a plantas não tratadas, permitiu antecipada maturação, com frutos mais uniformes, além de incremento na produtividade devido ao maior número de frutos, características estas desejáveis para comercialização. Esses mesmos resultados foram observados em tomate, morango e uva, nos quais foi constatado aumento na atividade fotossintética, promovendo a floração antecipada (ROCHER; BAUER; QUI, 2002).

Outro produto comercial à base de proteína harpina é o ProAct<sup>™</sup>, o qual contém em sua formulação, uma sequência de quatro fragmentos da referida proteína, isolados de três bactérias, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae*; são eles harpinN, harpinW, popA e harpinZ, respectivamente. Os dois primeiros são isolados de

*Erwinia amylovora* e são produzidos através da inserção de fragmentos de DNA dessas três bactérias em *Escherichia coli*, e seu modo de ação é considerado não tóxico (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005).

Em frutos de pessegueiro tratados com proteína harpina houve redução na área lesionada por *Monilinia fructicola*, com eficiência de controle estimada em 39,8% para o produto Messenger<sup>®</sup> e 31,5% com o uso do produto Por Act<sup>®</sup>, associada ao incremento na atividade da FAL, bem como ao acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos para ambos os produtos (DANNER et al., 2008).

#### 2.4.6 Acilbenzolar-S-metil e a Defesa Vegetal

Os produtos à base de acilbenzolar-S-metil (ASM) funcionam como indutores de resistência abióticos de baixa toxicidade para organismos não-alvo. O ASM tem apresentado resposta significativa na indução da RSA, através da ativação de genes de resistência em plantas de tabaco, tomate, pepino, trigo e *Arabidopsis thaliana*, a diversos agentes patogênicos, como *Pseudomonas syringae* pv 'tomate', *Peronospora parasitica*, *Blumeria graminis* f. sp. tritici e Tobacco mosaic vírus (TMV) (FRIEDRICH et al., 1996; GORLACH et al., 1996; LAWTON et al., 1996; ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005). O mecanismo de ação do composto estaria relacionado ao acúmulo de compostos fenólicos nos locais onde houve ferimento causado por agentes patogênicos (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005), como é o caso do ácido salicílico (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; MÉTRAUX, 2001; DURRANT; DONG, 2004), sendo o ASM uma molécula sintética que mimetiza a ação sinalizadora do AS.

Os dados de literatura indicam uma rápida ação e degradação do ASM. Entretanto, pôde ser observado em cacauieiro um período de ação do ASM de 15 dias após sua aplicação nas plantas, período considerado longo, e muito mais importante que a própria dosagem utilizada (CAVALCANTI; RESENDE, 2004). Para a cultura do morango, o ASM foi relacionado à redução da intensidade do mofo-cinza, causado por *Botrytis cinerea*, nos frutos (TERRY; JOYCE, 2000; MAZARO et. al., 2008). Em pós-colheita de pessegueiro, Danner et al. (2008) constataram redução na intensidade da podridão-parda (*Monilinia fructicola*) em pêssegos tratados com ASM. Para podridões pós-colheita de mamões, causadas

por *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* sp., o tratamento à base de ASM promoveu redução de 50 % na incidência da doença nos frutos (DANTAS et al., 2004).

O ASM aplicado em cafeeiro susceptível a *Hemileia vastatrix*, induz à RSA conferindo proteção às plantas, e, aplicado *in vitro* sobre o fungo, não interfere na germinação de esporos e formação de apressórios, evidenciando, dessa forma, que o produto não possui ação antimicrobiana direta (GUZZO et al., 2001).

O Actigard<sup>®</sup> 50WG e o Bion<sup>®</sup> 500 WG, ambos da empresa Syngenta, são produtos comerciais à base de ASM, cuja composição é de 50% do referido i.a, não apresentando qualquer efeito direto sobre os organismos alvo, atuando especificamente na indução de resistência nos vegetais de forma sistêmica, podendo ser aplicados via solo ou pulverizações foliares. Não foi comprovada toxicidade significativa em uma bateria de testes com cobaias, tratando-se, portanto, de um produto seguro, indicado principalmente para o manejo integrado de doenças (MAPA, 2008). No Brasil, este produto é registrado para as culturas de algodão, batata, cacau (mudas), citros (mudas), feijão, melão e tomate (MAPA, 2008).

Em nosso país, as pesquisas com eliciadores para cultura do morango são ainda escassas e normalmente restritas a aplicações em pré-colheita. Dessa forma, há grande demanda por testes também na área de pós-colheita, visto a importância da produção de morangos no país.

### 3 CAPÍTULO I – ELICIADORES EM PRÉ-COLHEITA

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) encontra-se em expansão devido, principalmente, a alta rentabilidade por unidade de área que a cultura proporciona, sendo uma boa opção para diversificação de pequenas propriedades.

Por esse motivo, especial atenção deve ser dada à forma de controle de doenças nesta cultura, uma vez que o morango é citado entre as culturas com maiores irregularidades quanto ao uso de agrotóxicos (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009). Dentre as doenças de ocorrência em pré-colheita, o mofo cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinerea* encontra-se entre as mais importantes. Esta doença é favorecida em condições de alta umidade relativa do ar (COSTA; VENTURA, 2006). Não obstante, a mancha-de-dendrofoma provocada pelo fungo *Dendrophoma obscurans*, embora não esteja presente na lista das doenças de maior importância econômica, pode tornar-se importante em condições de temperaturas elevadas, quando, em alta severidade, destrói a folhagem, reduzindo a área fotossinteticamente ativa (TANAKA, 2002).

Os eliciadores são conhecidos por promover a ativação de mecanismos de defesa em plantas contra diversos patógenos e insetos. A indução ocorre quando moléculas sinalizadoras dos agentes patogênicos ou dos eliciadores ligam-se às moléculas receptoras na planta ou fruto, desencadeando, a partir daí, diferentes respostas, como a hipersensibilidade, na qual as células adjacentes à lesão coalescem (DURRANT; DONG, 2004), além da formação de calos, lignificação, acúmulo de ácido salicílico (AS) e produção de fitoalexinas (WARD et al., 1991; GOELLNER; CONRATH, 2008). A partir da infecção primária de determinado agente patogênico, rizobactérias ou pulverização com eliciadores químicos, a planta será pré-condicionada à indução de resistência (DURRANT; DONG, 2004; GOELLNER; CONRATH, 2008).

O indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM), conhecido por mimetizar o efeito indutor do AS, tem sido estudado em diversas espécies, com promoção na indução de resistência para tabaco (FRIEDRICH et al., 1996; LAMONDIA, 2009), tomate (HACISALIHOGU et al., 2007; MALOLEPSZA, 2006), cacau (CAVALCANTI; RESENDE, 2004), melão (SALES JUNIOR; PONTES FILHO; NUNES, 2007), pimenta (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005), manga (CAZORLA et al., 2006) e pêssego (DANNER et al., 2008). Em morango, o ASM apresentou eficiência na redução da incidência e

severidade da mancha-de-micosferela, incidência de flor-preta e incidência da mancha-de-dendrofoma; o eliciador ainda foi relacionado ao aumento da produção de compostos do metabolismo secundário (MAZARO, 2007). O ASM também foi eficiente contra a bacteriose causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão e o controle foi associado à atividade de diversas enzimas envolvidas na indução de resistência (KUHN, 2007). Com plantas de trigo em hidroponia, Heil et al. (2000) obtiveram crescimento mais rápido e maior acúmulo de biomassa em plantas não tratadas com ASM do que aquelas tratadas. Esse efeito se tornou visível 3 a 4 semanas após a aplicação dos tratamentos; em campo, os resultados seguiram a mesma tendência tanto para biomassa de parte aérea quanto de raízes. Por outro lado, Marchese (2006), embora tenha observado incrementos na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> com aplicação de ASM e harpina em *Artemisia annua*, não observou acúmulo de biomassa em relação às plantas controle.

A proteína harpina, presente em algumas bactérias fitopatogênicas como *Erwinia amylovora* também é conhecida pela sua ação indutora de resistência. Em *Arabidopsis*, embora tenha ocorrido indução de resistência, ficou claro que o acúmulo do AS não é o único sinal envolvido na indução (DONG et al., 1999). Para Hutcheon, Rocher e Qui (2002), além de uma rota de sinalização por AS, a proteína harpina pode ainda induzir a resistência por uma via de sinalização dependente de ácido jamônico/etileno. A proteína harpina tem apresentado ação indutora em espécies como morango, tomate, uva (ROCHER; BAUER; QUI, 2002), cerejas (QUI; CLAYTON, 2002a) e pêssegos (DANNER et al., 2008). Além da ação na indução de resistência, a harpina tem sido associada à maior atividade fotossintética (MARCHESE, 2006), promovendo o acúmulo de biomassa (ROCHER; BAUER; QUI, 2002).

No Brasil poucos são os estudos com eliciadores para cultura do morango, necessitando de maiores informações pertinentes aos efeitos sobre diversos fitopatógenos, produtividade, atividade fotossintética, e o efeito de diferentes eliciadores e suas respectivas dosagens. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo comparar os eliciadores harpina e ASM, aplicados em pré-colheita, sobre a indução de resistência contra as doenças do morango causadas por *B. cinerea* e *D. obscurans*, bem como verificar seus efeitos sobre o metabolismo das plantas por meio de análises bioquímicas.



## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes pré-colheita em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) foram realizados através de dois experimentos. O primeiro experimento foi conduzido do dia 29/04 a 10/09/2009 em casa-de-vegetação (Figura 01A), com temperaturas programadas, variando entre 13° e 28 °C. O segundo experimento foi conduzido do dia 01/07 a 10/10/2009 em estufa plástica (Figura 01B) sob temperatura média de 20°C. Tanto a casa-de-vegetação quanto a estufa estão localizadas no *Campus* Pato Branco, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, latitude 26°11'50" S e longitude 52°41'26"W (UTFPR).



**Figura 01** – Condução dos experimentos em casa-de-vegetação (A) e em estufa plástica (B). UTFPR, 2009.

### 3.2.1 Experimento 1

#### 3.2.1.1 Condução das plantas

O delineamento experimental para o primeiro experimento foi o de blocos ao acaso com três repetições e quatro tratamentos (4x3), sendo cada unidade experimental constituída por 16 vasos com uma planta cada, da cultivar Camarosa importadas do Chile. Destas plantas, seis foram destinadas a avaliações de produtividade e incidência de podridões nos frutos, cinco plantas para avaliações de incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma e mais cinco plantas para coleta de folhas para análises bioquímicas. O croqui pode ser visualizado no APÊNDICE A. O substrato para plantio foi constituído de mistura de solo, húmus e

vermiculita (6:3:1), apresentando as seguintes condições nutricionais: 73,71 g dm<sup>-3</sup> MO; 86,04 mg dm<sup>-3</sup> P; 2,80 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> K; 5,77 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Ca; 4,40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Mg; V% 77,16; CTC = 16,81; e pH (CaCl<sub>2</sub>) 5,2.

No dia 29/04/2009 foi realizado o transplante das mudas para os vasos (volume 4,5 L), os quais permaneceram em casa-de-vegetação sob irrigação por aspersão, realizada sempre que o solo se apresentava seco (a cada dois dias, aproximadamente). Antes do início da aplicação dos tratamentos foram realizadas duas pulverizações de fungicida com o intuito de manter as plantas saudáveis: a primeira aplicação foi com o fungicida Azoxistrobin na dosagem de 175 mg L<sup>-1</sup>, 15 dias após o plantio (DAP), e a segunda aplicação foi com o fungicida Cercobin na dosagem de 700 mg L<sup>-1</sup>, 33 DAP. Além disso, foi aplicado o inseticida Conect na dosagem de 2 mL L<sup>-1</sup> para o controle de pulgões aos 111 DAP.

### 3.2.1.2 Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos por três produtos comerciais, dois deles da empresa Eden Bioscience tendo como princípio ativo a proteína harpina, sendo estes Messenger<sup>®</sup> (3% i.a.) na dosagem de 750 mg L<sup>-1</sup> e ProAct<sup>™</sup> (1% i.a.) na dosagem de 2,5 g L<sup>-1</sup>, um produto à base de ASM, sendo este o Bion<sup>®</sup> 500WG da empresa Syngenta na dosagem de 500 mg L<sup>-1</sup> do produto, e uma testemunha (água destilada). Ao todo, foram cinco aplicações dos tratamentos, realizadas a cada quinze dias, iniciando aos 61 DAP.

As coletas de materiais vegetais para análises bioquímicas foram realizadas às 24 horas antes da primeira aplicação dos tratamentos (60 DAP) e 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação, bem como 24 horas antes da segunda aplicação dos tratamentos (75 DAP), e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação. Os materiais vegetais coletados foram embrulhados em papel-alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido a -180 °C e armazenados a -40 °C.

Após 24 horas da segunda aplicação dos tratamentos, foi realizada a inoculação do fungo *B. cinerea* na concentração de 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. O inóculo foi isolado a partir de frutos doentes, e cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) mantido em estufa incubadora tipo B.O.D. a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias. Os conídios foram retirados através de pincel úmido e diluídos em água destilada, efetuando-se posteriormente a contagem dos conídios para ajuste da suspensão, com auxílio da câmara de Neubauer, onde

foi feita a contagem em quatro quadrantes, e os dados obtidos, submetidos à seguinte equação:  $N^{\circ}$  de conídios  $mL^{-1} = (N^{\circ}$  total de conídios/ $N^{\circ}$  de quadrantes contados) x 10000.

### 3.2.1.3 Avaliações

As avaliações de produtividade foram realizadas em um grupo de seis plantas por parcela. Duas vezes por semana eram colhidos os frutos sadios, procedendo-se à contagem e pesagem dos mesmos. A partir desses valores, obteve-se o número de frutos comercializáveis por planta (NFC), a massa dos frutos comercializáveis por planta (MFC) e a massa média dos frutos comercializáveis (MMC). No total foram realizadas dezenove avaliações de produtividade, iniciadas aos 68 DAP e encerradas aos 130 DAP. Nessas mesmas avaliações também foi observado o número de frutos com sintomas aparentes provocados pelo fungo *B. cinerea*, caracterizando a incidência de frutos podres, sendo esta equivalente à porcentagem de frutos tomados pelo mofo-cinzento em relação ao total de frutos (Figura 02B).



**Figura 02** – Folhas com sintomas da mancha-de-dendrofoma (A). Fruto com sintoma característico do mofo-cinzento (B). UTFPR, 2009.

A incidência e a severidade da mancha-de-dendrofoma (Figura 02A) de ocorrência natural foram avaliadas em intervalos de dez dias, iniciando-se aos 68 DAP, totalizando seis avaliações encerradas aos 118 DAP. Para avaliação da doença, foi utilizada escala diagramática específica para cultura do morango, a qual pode ser visualizada no ANEXO A (MAZARO et al., 2006).

Concomitante às avaliações da mancha-de-dendrofoma, foram realizadas avaliações da porcentagem de flores abortadas em plantas destinadas à colheita de frutos, com o intuito de relacioná-las à produtividade. Ao todo, foram quatro avaliações a cada dez dias, com início aos 78 DAP e término aos 108 DAP. Além disso, aos 108 DAP foi realizada avaliação para incidência de ácaros de ocorrência natural, ocasião em que foram contadas, por parcela, as plantas que continham sintomas visíveis de ácaros.

Após 48 horas da última aplicação dos tratamentos, aos 148 DAP, foi realizada avaliação de trocas gasosas nas plantas, com auxílio de IRGA (analisador portátil de CO<sub>2</sub> a infravermelho) modelo LI-6400xt da LI-COR. As condições microclimáticas na câmara de medidas foram mantidas em  $\pm 26$  °C de temperatura, 1300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR (Radiação fotossinteticamente ativa), UR 61%, e 400 ppm CO<sub>2</sub>. Foi avaliada uma folha por planta, em três plantas por tratamento. As folhas foram limpas e secas com papel-toalha, e nelas foram feitas leituras em triplicata (Figura 03).



**Figura 03** – Avaliação das trocas gasosas das plantas de morango através do analisador portátil de CO<sub>2</sub> a infravermelho (IRGA). UTFPR, 2009.

Foram determinadas as proteínas totais nos tecidos vegetais, utilizando-se o teste de Bradford (1976). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 630 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes  $\mu\text{g}$  de soro-albumina bovino por mL de amostra ( $\mu\text{g}$  proteína mL<sup>-1</sup>).

A quantificação da atividade da enzima FAL foi realizada por meio de metodologia adaptada de Rodrigues, Bezerra Neto e Coelho (2006), em que foi macerado aproximadamente 1 g por amostra de tecido vegetal em tampão TRIS – HCl pH 8,00 a 4 °C; o extrato foi colocado em tubos “ependorf” e posteriormente centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Coletaram-se 400  $\mu\text{L}$  do sobrenadante dissolvendo-o em 800  $\mu\text{L}$  do

tampão de extração (TRIS – HCl pH 8,00) e 800  $\mu\text{L}$  de L-fenilalanina (6  $\mu\text{M}$ ). A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada em banho-maria durante 1 hora a 40 °C. Decorrido este tempo, foi adicionada a cada tubo 100  $\mu\text{L}$  de HCl 5N, para cessar a atividade enzimática. Procedeu-se, então, à quantificação do ácido *trans*-cinâmico em espectrofotômetro (modelo SP 2100, da “Spectrum”) a 290 nm.

Os fenóis totais foram quantificados por meio da pesagem de aproximadamente 200 mg de tecido vegetal macerados em 10 mL de acetona 70%, sobre gelo. O macerado foi transferido para tubos “ependorf” e estes centrifugados durante 10 minutos, a 4 °C e 3000 rpm. A partir daí, foram coletados 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra e alocados em tubos de ensaio em triplicata, e a estes foram acrescentados 450  $\mu\text{L}$  de água destilada, 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu diluído (1:4) e 1,25 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20%. Os tubos foram agitados em vórtex para posteriormente efetuar a leitura em espectrofotômetro a 725 nm. O teor de fenóis totais foi calculado em equivalentes de tirosina, através de curva-padrão, e expresso em função da matéria fresca (NOZELLA, 2001).

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste *f* a 5% de probabilidade de erro e para comparação de médias foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; para tanto, foi utilizado o programa de análises estatísticas ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2002).

### 3.2.2 Experimento 2

#### 3.2.2.1 Condução das plantas

O delineamento experimental para o segundo experimento foi o de blocos ao acaso com oito tratamentos e quatro repetições (8x4), sendo cada bloco constituído por um canteiro de aproximadamente 60 metros e cada unidade experimental, com aproximadamente 7,5 m, constituída por 25 plantas da cultivar Aromas importadas da Argentina. O croqui pode ser visualizado no APÊNDICE B. O preparo dos canteiros e a adubação foram realizados no mês de junho. Os canteiros de 1 m de largura e 30 cm de altura foram preparados sobre solo com as seguintes condições nutricionais, após a realização das adubações: 37,53  $\text{g dm}^{-3}$  MO; 55,16  $\text{mg dm}^{-3}$  P; 1,28  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  K; 6,92  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  Ca; 2,54  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  Mg; V% 78,45; CTC = 13,69; e pH ( $\text{CaCl}_2$ ) 5,7.

No dia 01/07/2009 foi realizado o transplante das mudas para os canteiros, sob irrigação por aspersão a cada dois dias. Antes do início da aplicação dos tratamentos, foram feitas três pulverizações com o fungicida Azoxistrobin na dosagem de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , aos 10 DAP, 25 DAP e 40 DAP, com o intuito de manter as plantas saudas e assim evitar o pré-condicionamento das mesmas.

Os tratamentos foram constituídos por três doses de harpina (100; 200 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de ProAct<sup>TM</sup>/Eden Bioscience 1% i.a) e quatro doses de ASM (100; 200; 300 e  $400 \text{ mg L}^{-1}$  de Bion<sup>®</sup> 500WG/Syngenta, 50% i.a), além de um tratamento testemunha (água destilada). Ao todo foram cinco aplicações dos tratamentos realizadas semanalmente e iniciadas aos 50 DAP.

Passadas 24 horas da primeira aplicação dos tratamentos, foi realizada a inoculação com 1 mL de suspensão de conídios do fungo *B. cinerea* na concentração de  $10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . O inóculo foi isolado a partir de frutos doentes, sendo o cultivo e a contagem dos esporos conduzidos da mesma forma descrita no experimento anterior.

### 3.2.2.2 Avaliações

A avaliação de trocas gasosas nas plantas com o IRGA (modelo LI-6400 da LI-COR) foi realizada 24 horas antes da primeira aplicação dos tratamentos (49 DAP) e 24 horas após (51 DAP) sob as mesmas condições microclimáticas na câmara de medidas citadas para o experimento 1. Para tanto foi selecionada uma folha por planta, em uma planta por tratamento, as folhas foram limpas e secas com papel-toalha e nelas foram realizadas leituras em triplicata (Figura 03).

As avaliações de produtividade NFC, MFC e MMC foram realizadas em um grupo de 20 plantas por parcela, onde duas vezes por semana eram colhidos os frutos saudáveis e maduros, procedendo-se à contagem e pesagem dos mesmos. No total, foram realizadas oito avaliações de produtividade, iniciadas aos 68 DAP e encerradas aos 100 DAP. Nestas avaliações também foi observado o número de frutos atacados pelo mofo-cinzento em relação ao total de frutos.

Aos 75 DAP, 24 horas após a quarta aplicação dos produtos, os frutos colhidos foram destinados a testes em pós-colheita, quanto à área lesionada e firmeza de polpa. O procedimento será descrito e discutido no capítulo 2 desta dissertação.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade de erro e para interações significativas foi aplicado teste de regressão separadamente, para cada produto. Para tanto, foi utilizado o programa de análises estatísticas ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2002).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1 foi possível observar redução significativa da da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha-de-dendrofoma de ocorrência natural com o uso de harpina e ASM, onde o na testemunha foi de 132 e passou para 44 com ProAct™, 30 com Messenger® e 39 com o produto Bion® (Tabela 01). Além disso, a incidência de ácaro foi significativamente reduzida com o uso de harpina para ambos os produtos, ProAct™ e Messenger®.

**Tabela 01** – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha-de-dendrofoma. Porcentagem de plantas com ácaros. Porcentagem de flores abortadas (FA) e porcentagem de frutos podres (FP), em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion®, Messenger® e ProAct™. UTFPR, 2009.

<b>Tratamento</b>	<b>AACPD</b>	<b>Ácaro (%)</b>	<b>FA (%)</b>	<b>FP (%)</b>
Testemunha	132 a*	20,9 a	56,4 a	29,3 a
ProAct™	44 b	0,0 b	14,7 b	11,5 b
Messenger®	30 b	4,3 b	13,8 b	7,9 b
Bion®	39 b	18,8 a	17,3 b	11,5 b
<b>CV%</b>	<b>18,5</b>	<b>25,9</b>	<b>23,57</b>	<b>33,1</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Esses resultados estão de acordo com outros de diversos estudos que apontam o ASM e a proteína harpina como eficientes eliciadores, como em plantas de pimenta em que a redução dos sintomas causados por *Phytophthora capsici* foi de 45% com aplicação de ASM, comparado à testemunha, aos sete dias após a inoculação do patógeno (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005). Na cultura do morango, Carré-Missio et al. (2006) constataram efeito da



aplicação de ASM sobre a doença conhecida por mancha de pestalótia causada pelo fungo *Pestalotia longiseluta*, em que a severidade foi reduzida significativamente em 85% nas plantas inoculadas com o fungo seis dias após a aplicação dos tratamentos, e 88% nas plantas inoculadas aos doze dias após os tratamentos, quando comparadas às plantas testemunha. Essa redução na severidade pelo uso do ASM foi equivalente ao controle proporcionado pelos fungicidas Azoxystrobin e Mancozeb, comumente utilizados no controle de doenças para cultura do morango.

Tubajika et al. (2007) conduziram testes em videira, por dois anos, e verificaram em média uma redução de 74% na incidência de *Xylella fastidiosa* na dosagem mais alta de harpina ( $480 \text{ g ha}^{-1} \text{ i.a.}$ ), a qual corresponde a aproximadamente dez vezes a dosagem utilizada em nosso estudo ( $45 \text{ g ha}^{-1} \text{ i.a.}$ ). Em tomateiro, a incidência da doença provocada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* foi reduzida de forma significativa com o uso de ASM na concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , aplicado nas plantas duas vezes antes e quatro vezes depois da inoculação da bactéria (HACISALIHOGU et al., 2007). Ainda em tomateiro, a harpina reduziu significativamente a severidade da bactéria *Xanthomonas campestris* em relação ao controle, porém, foi menos eficiente que ASM. Entretanto, deve-se ressaltar que os tratamentos foram aplicados nas plantas após a inoculação da bactéria (OBRADOVIC et al., 2004). Neste caso, destacamos a importância que tem o momento adequado da aplicação dos eliciadores, de preferência nas fases iniciais, possibilitando um pré-condicionamento das plantas, antes que ocorra a infecção.

Lin; Ishizaka; Ishii (2009) também observaram o controle de míldio em folhas de plantas de pepino tratadas com ASM antes da inoculação do fungo, comparadas ao tratamento controle (água destilada), onde a severidade foi 0% localmente (nas folhas inoculadas) e 0,3 sistemicamente (na planta). Entretanto, os mesmos autores comentam que ao aplicar o ASM depois da inoculação do fungo, embora tenha ocorrido redução das infecções por míldio em relação ao controle, os valores foram maiores aos observados nas plantas tratadas com ASM antes da inoculação, sendo a severidade de 1,3% e 1,7% local e sistêmica, respectivamente, enquanto para o controle foi observada severidade de 2,9% local e 3,4% sistêmica. Estes valores são muito semelhantes aos encontrados no presente trabalho, no qual, mesmo tendo sido realizadas aplicações de fungicidas para manter as plantas saudáveis antes das aplicações dos tratamentos e sem a inoculação do fungo *D. obscurans*, houve redução significativa na incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma com a aplicação dos eliciadores.

Os valores encontrados para incidência e severidade de dendrofoma foram baixos, fato associado à fase fenológica das plantas, visto que esta doença ocorre com maior



intensidade no início e no final do ciclo da cultura (COSTA; VENTURA, 2006; MAZARO, 2007). Lin; Ishizaka; Ishii (2009) observaram valores de severidade altos para antracnose em pepino, porém, com a mesma tendência de redução da severidade nas plantas tratadas com ASM antes da inoculação do fungo *Colletotrichum orbiculare*, em relação àquelas tratadas depois da inoculação do fungo, embora nestas, também tenha ocorrido redução significativa da doença em relação à testemunha.

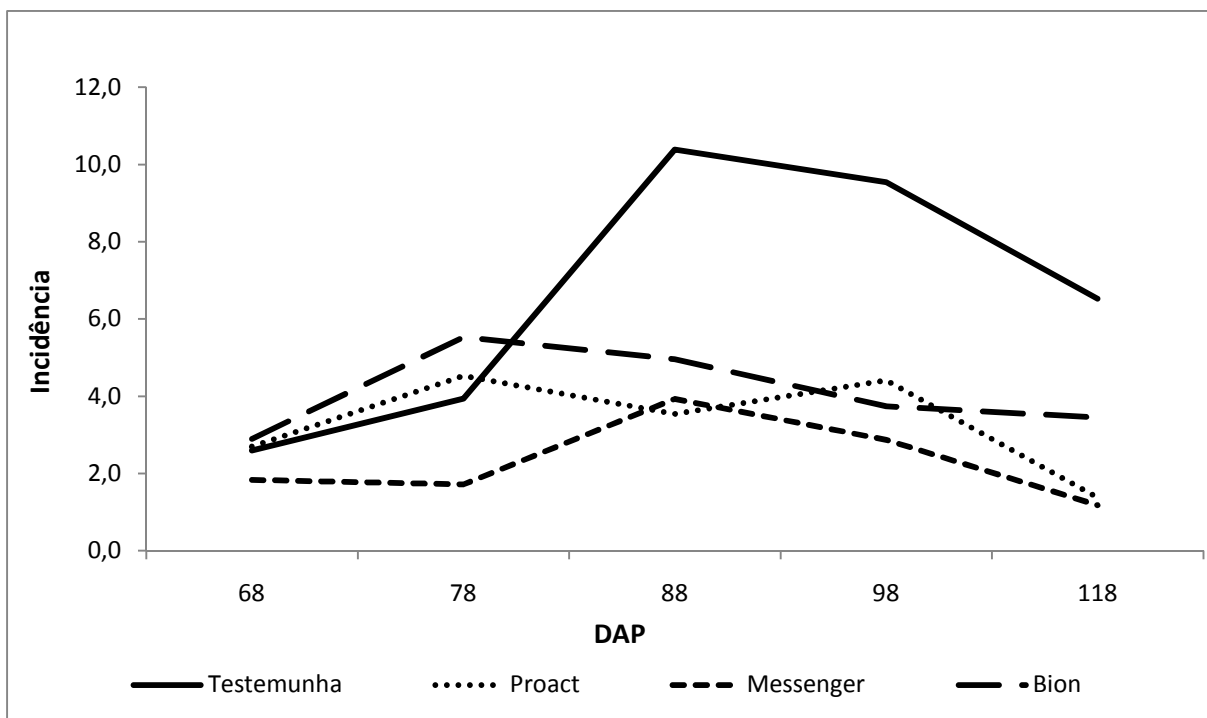
A proteína harpina e o ASM também foram eficientes para manter as flores sadias (Tabela 01), em que a porcentagem de flores abortadas foi reduzida de maneira significativa: de 56,4% na testemunha para 14,7% no tratamento ProAct™, 13,8% para Messenger® e 17,3% no tratamento Bion®. O tratamento-testemunha também apresentou maior porcentagem de frutos podres, principalmente por *B cinerea*, e diferiu de forma significativa dos demais tratamentos, reduzindo de 29,3% na testemunha para 11,5%, 7,9% e 11,5% nos tratamentos ProAct™, Messenger® e Bion®, respectivamente (Tabela 01). Esses dois parâmetros estão relacionados, já que a podridão dos frutos pode ocorrer por ocasião da presença do inóculo latente desde o processo de polinização da flor até a formação do fruto. O fungo *B. cinerea*, causador de podridões pós-colheita em morango, encontra-se presente em sépalas e pétalas das flores de morango, as quais são importantes fontes de inóculo. Na maioria dos casos, entre 65 a 85% dos frutos podres, a infecção tem início nas regiões basais de inserção dos frutos às sépalas (BOFF et al., 2003). Além disso, Marchese (2006) cita que a fase de floração é um momento importante no desenvolvimento das plantas que buscam a produção de sementes para a perpetuação da espécie, e a proteção exercida pela produção de metabólitos secundários nesta fenofase é maior. O autor cita como exemplo o acúmulo de artemisinina durante a floração em *Artemisia annua*. Sendo assim, os eliciadores podem ter aumentado a produção de compostos de defesa nessa importante fase da cultura do morango, reduzindo não só o número de flores abortadas, mas também o número de flores infectadas por *B. cinerea*, pela diminuição da podridão dos frutos. Mazaro (2007) constatou a segunda menor incidência de flor-preta, causada por *Colletotrichum acutatum*, nas plantas de morango tratadas com ASM, ficando atrás apenas do tratamento com fungicida, não apresentando, porém, diferença significativa deste.

Além disso, os eliciadores podem ter agido diretamente sobre a podridão dos frutos, ao torná-los física e quimicamente mais resistentes como tem sido apontado na pós-colheita de diversos frutos submetidos à indução de resistência por harpina, como em pimentão (AKBUDAK et al., 2006), cereja, laranja, tomate, maçã e uva (QUI; CLAYTON, 2002b), em maçã (CAPDEVILLE et al., 2008) e em pêssego (DANNER et al., 2008) e por ASM, em

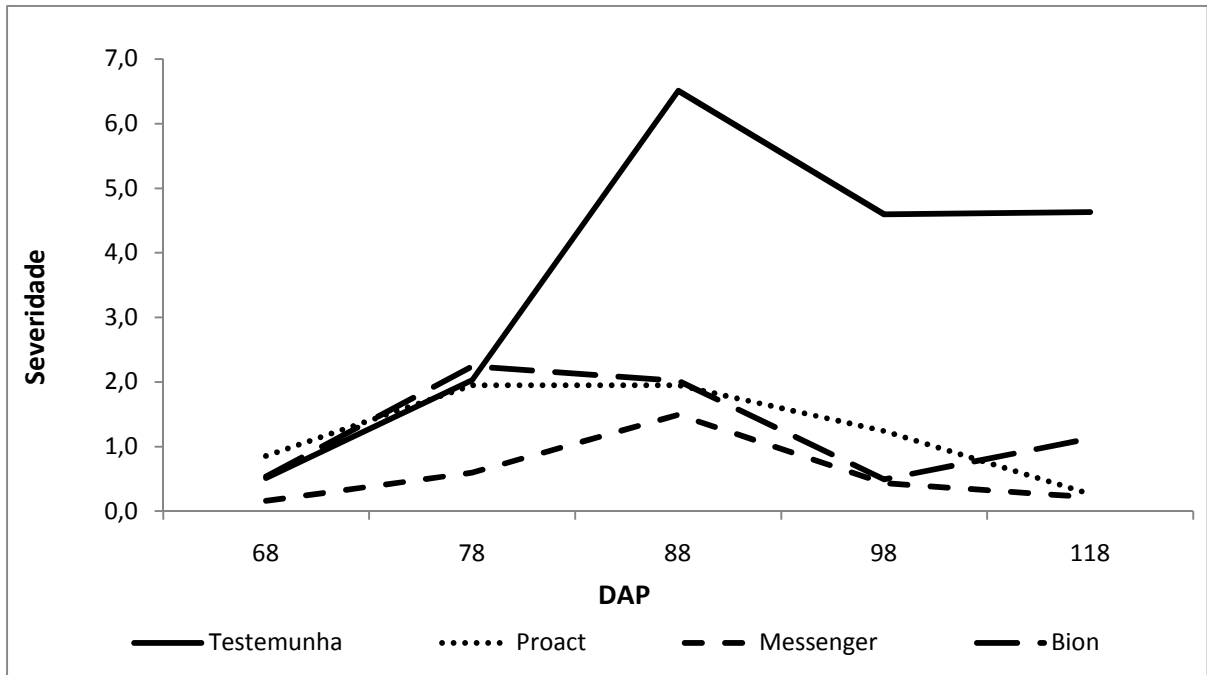
morango (MAZARO et al., 2008), maçãs (SAUTTER et al., 2008; SPADARO; GARIBALDI; GULLINO, 2004), tomate (OBRADOVIC et al., 2004) e em pêssego (DANNER et al., 2008).

Os valores de incidência e severidades da mancha-de-dendrofoma para os tratamentos à base de harpina e ASM permaneceram baixos durante todo período de avaliação e foram significativamente inferiores à testemunha, como pode ser observado nas curvas de progresso da doença para incidência (Figura 04) e severidade (Figura 05).

O comportamento das curvas de progresso para incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma, foi semelhante ao comportamento das curvas de progresso para incidência e severidade relatadas por Mazaro (2007) para mancha de micosferela em morango, onde a testemunha apresentou, durante todo o período de avaliação, valores superiores aos apresentados para os indutores quitosana e ASM, bem como para mancha-de-dendrofoma, em que a testemunha também diferiu dos tratamentos com indutores, exceto nas duas últimas avaliações.



**Figura 04** – Curva de progresso da incidência da mancha-de-dendrofoma em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.



**Figura 05** – Curva de progresso da severidade da mancha-de-dendrofoma em morango, cultivar Camarosa tratado Bion®, Messenger® e ProAct™. UTFPR, 2009.

O maior número de frutos comercializáveis por planta foi observado no tratamento com o produto Messenger®, diferindo significativamente da testemunha, mas não de ProAct™ e Bion®. Este último, porém, não diferiu de maneira significativa da testemunha (Tabela 02). A massa dos frutos comercializáveis por planta, bem como a massa média dos frutos comercializáveis, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Tabela 02). A produtividade observada, bem como o número de frutos por planta, pode ser considerada baixa em função de a colheita ter sido realizada em um curto período de tempo, apenas dois meses, quando é sabido que o período produtivo para esta cultivar inicia em julho (CAMARGO FILHO; CAMARGO, 2009) e estende-se até o mês de janeiro (CANSIAN et al., 2002). Para a cultivar Camarosa, podem ser encontradas produtividades variando entre 0,4 kg (CANSIAN et al., 2002) a 1 kg planta<sup>-1</sup> (CALVETE et al., 2007). Mesmo não havendo diferença significativa, os tratamentos com harpina apresentaram os maiores valores para a massa média de frutos comercializáveis, acima de 9 g planta<sup>-1</sup>, que, muito embora sejam inferiores ao esperado para a cultivar Camarosa que gira em torno de 13 g planta<sup>-1</sup>, podem ser considerados normais (VERONA et al., 2007).

O maior número de frutos comercializáveis e maior massa média de frutos comercializáveis nos tratamentos com harpina foram correlacionados à maior atividade fotossintética, que se mostrou maior no tratamento ProAct™, seguido pelo tratamento

Messenger<sup>®</sup>, os quais foram estatisticamente iguais; já o tratamento com Bion<sup>®</sup> não diferiu da testemunha (Tabela 02).

**Tabela 02** – Número de frutos comercializáveis por planta (NFC), massa dos frutos comercializáveis por planta (MFC), massa média dos frutos comercializáveis (MMC) e fotossíntese (FT), em morango, cultivar Camarosa tratado com Bion<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>. UTFPR, 2009.

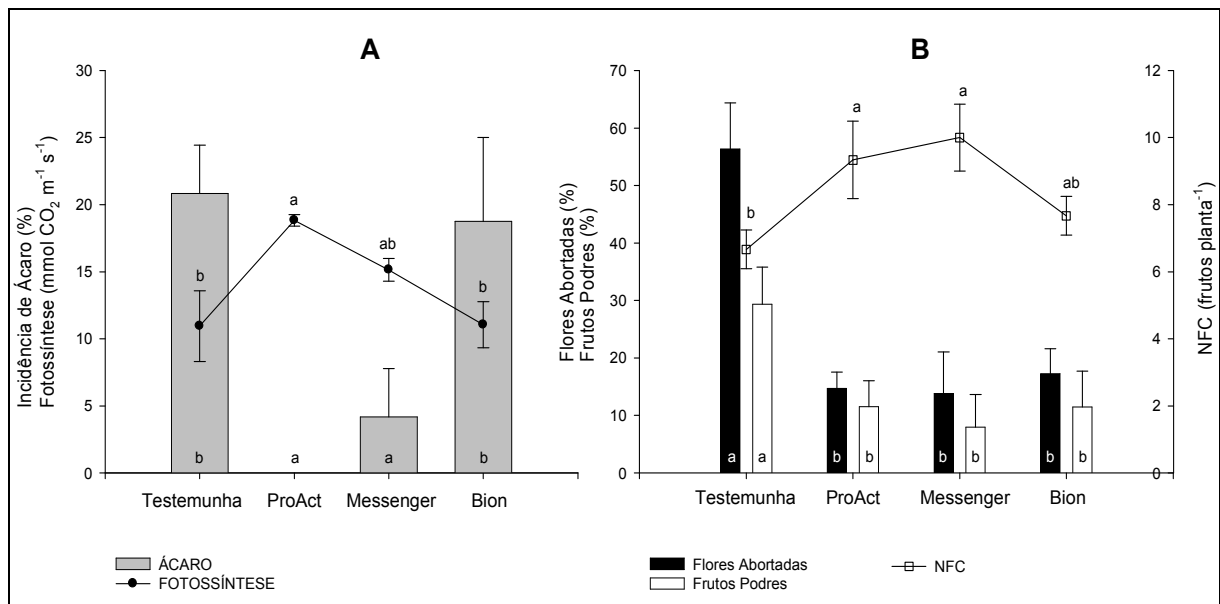
Tratamento	NFC (Frut. Planta <sup>-1</sup> )	MFC (g planta <sup>-1</sup> )	MMC (g fruto <sup>-1</sup> )	FT ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
Testemunha	6,7 b	57,67 a	8,52 a	10,95 b
ProAct <sup>™</sup>	9,3 a	89,00 a	9,91 a	18,84 a
Messenger <sup>®</sup>	10,0 a	88,00 a	9,06 a	15,15 ab
Bion <sup>®</sup>	7,6 ab	59,67 a	7,88 a	11,06 b
<b>CV%</b>	<b>10,66</b>	<b>18,07</b>	<b>10,13</b>	<b>11,34</b>

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

A proteína harpina é reconhecida como potencializadora do aumento de biomassa (WEI et al., 1992; LESTER; BUBENHEIM; ROCHER, 2002; QUI; CLAYTON, 2002a; U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002; DONG et al., 2004; TUBAJIKA et al., 2007), possivelmente promovida pela maior assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, ou seja, maior atividade fotossintética (MARCHESE, 2006). Entretanto, a baixa atividade fotossintética na testemunha e no tratamento Bion<sup>®</sup> está mais atrelada à maior incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma na testemunha, bem como a alta incidência de ácaros nesses tratamentos (Figura 06), do que a um possível aumento na atividade fotossintética dos tratamentos com harpina. Hacısalihoglu et al. (2007) observaram redução na produção de matéria seca de plantas de tomate tratadas e não tratadas com ASM, com a inoculação da bactéria *R. solanacearum*, que foi associada de forma negativa às concentrações de cálcio, boro e fósforo nas folhas, indicando que a redução de biomassa está muito mais relacionada à infecção pelo patógeno e sua ação degenerativa do que ao uso do indutor.

Os menores níveis de incidência de ácaros nos tratamentos com harpina podem estar correlacionados à indução de resistência à herbivoria promovida por este eliciador, uma vez que a harpina atua em um amplo espectro de defesa, induzindo resistência contra vírus, bactérias, fungos e outros estresses (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002), ativando simultaneamente rotas de defesa dependentes de AS e ácido jasmônico/etileno (AJ/ET). Essa característica confere à planta a capacidade de responder

positivamente contra patógenos e também contra insetos (STASWICK; LEHMAN, 1999), enquanto o ASM atua apenas contra patógenos. Em estudo com videira a campo, a aplicação de harpina reduziu tanto as infecções causadas por *X. fastidiosa*, quanto a população do vetor que a transmite (*Homalodisca coagulata*) (TUBAJIKA et al., 2007). Dong et al. (2004) também observaram expressiva redução da incidência de afídeos mediante aplicação de harpina em *Arabidopsis* e relacionaram tal resposta à ativação de uma rota sensível ao etileno. Ainda com *Arabidopsis*, plantas mutantes para os genes *nahG* que impossibilita o acúmulo de AS, e *NIMI* que não responde ao AS, não apresentaram resposta de hipersensibilidade e ativação de genes para expressão da RSA; entretanto, desenvolveram algum tipo de resistência em resposta ao metil jasmonato (MJ) e ET (DONG, et al., 1999).

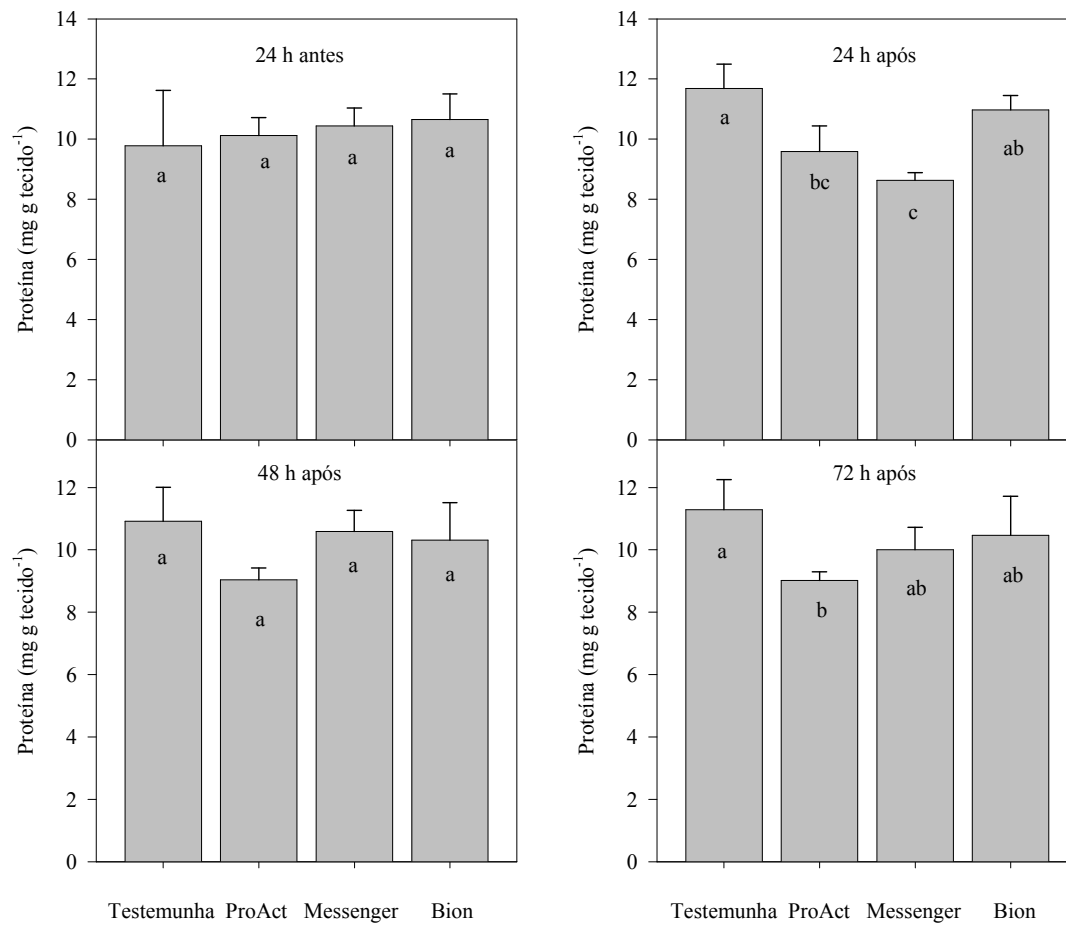


**Figura 06** – Incidência de ácaro e fotossíntese em plantas de morango, cultivar Camarosa, tratadas com ProAct™, Messenger® e Bion® (A). Percentual de flores abortadas, frutos podres e número de frutos comercializáveis (NFC) em morango, cultivar Camarosa, tratado com ProAct™, Messenger® e Bion® (B). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas ou nas colunas de mesma cor, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. UTFPR 2009.

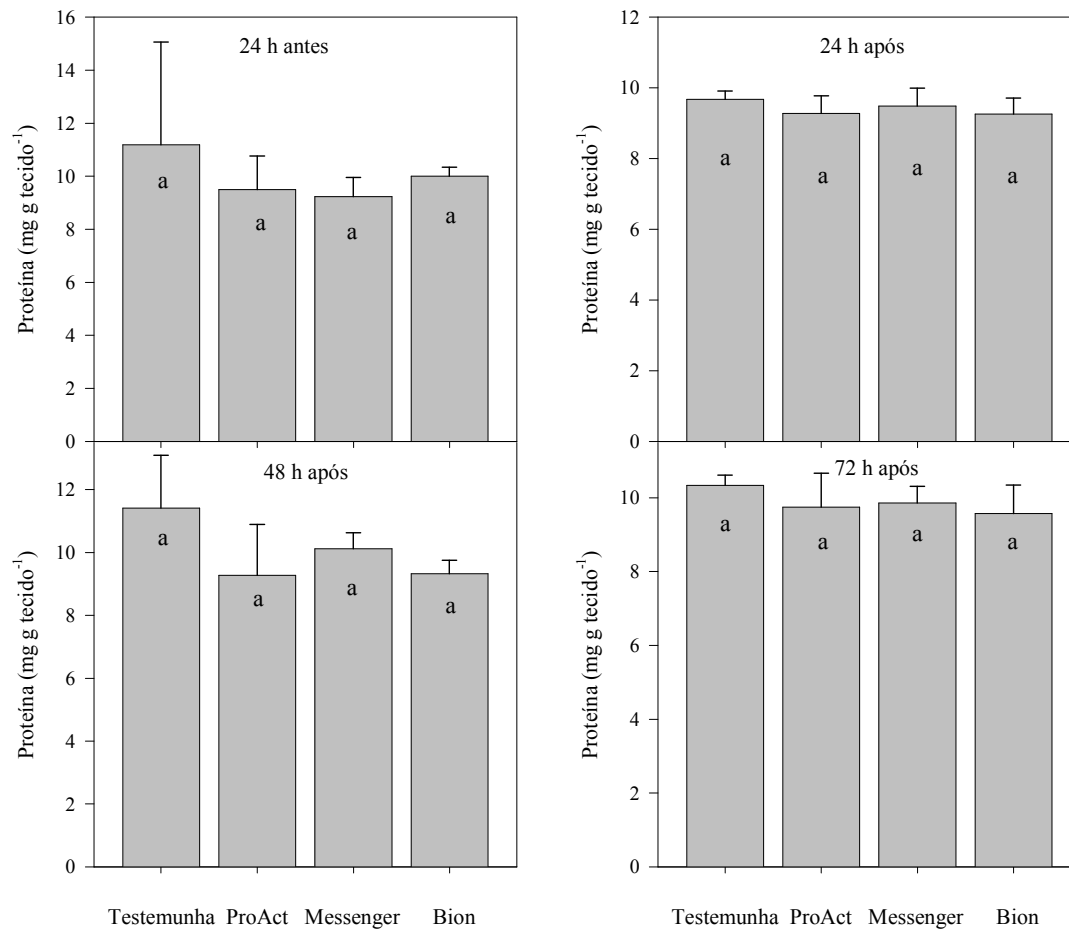
As plantas dos tratamentos com harpina apresentaram maior número de frutos comercializáveis em resposta a um conjunto de fatores, entre eles a maior atividade fotossintética associada à menor incidência de ácaros, além de uma menor porcentagem de flores e frutos danificados (Figura 06), que juntos traduziram-se em melhor desempenho para este eliciador.

Porém, deve-se esclarecer quais foram os fatores metabólicos ou mecanismos que levaram a harpina a apresentar estas melhores respostas em função dos menores índices relacionados tanto à mancha-de-dendrofoma, quanto ao *B. cinerea* e à presença de ácaros.

O conteúdo de proteínas totais apresentou uma tendência a diminuir nos tratamentos com os eliciadores harpina e ASM, tanto nas análises realizadas após a primeira aplicação dos tratamentos, como em relação às aquelas realizadas depois da segunda aplicação, embora nesta última os valores não tenham diferido de forma significativa (Figura 07 e 08). A condição nutricional da planta pode ter influenciado essas respostas, uma vez que não foi feita adubação de cobertura. Desta forma, ao demandar substrato para a produção de enzimas e compostos necessários para a defesa, a planta pode ter realocado nutrientes para este fim, quebrando as proteínas existentes. Os mecanismos para indução de defesa incorrem em custos, ou seja, alocação de reservas das plantas, mesmo sendo estabelecida apenas quando requerida, entretanto, poucos estudos têm abordado os custos dessa defesa. Devido à habilidade das plantas em dividir os nutrientes entre crescimento e defesa, os custos desta última podem ser visíveis apenas em condições limitantes (HEIL, 2001). Em estudo com batata, os níveis da enzima Rubisco diminuíram com a infecção do patógeno, bem como, com a aplicação de eliciadores (LONNGEMAN, 1995). Aminoácidos liberados pela degradação de proteínas fotossintéticas podem ser reutilizados na síntese de proteínas de defesa, levando à perda de clorofila e rubisco (WEIDHASE et al., 1987; REINBOTHE; MOLLENHAUER; REINBOTHE, 1994).



**Figura 07** – Conteúdo de proteínas totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 8,8. UTFPR, 2009.



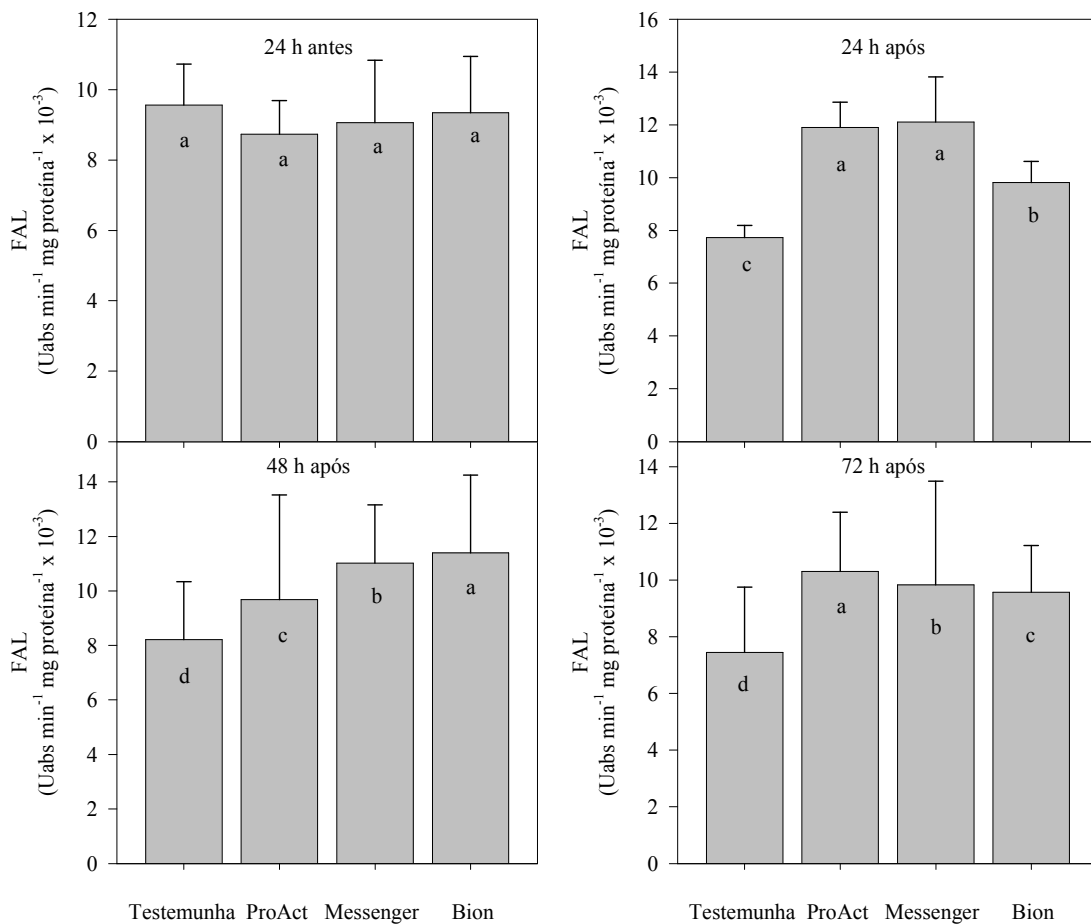
**Figura 08** – Conteúdo de proteínas totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 12,4. UTFPR, 2009.

Os resultados para proteínas podem ser relacionados com a maior atividade da FAL, que foi incrementada de forma significativa nos tratamentos com os eliciadores à base de harpina e ASM depois da primeira e segunda aplicação dos tratamentos (Figuras 09 e 10), indicando que realmente pode ter ocorrido quebra de proteínas para síntese de enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa.

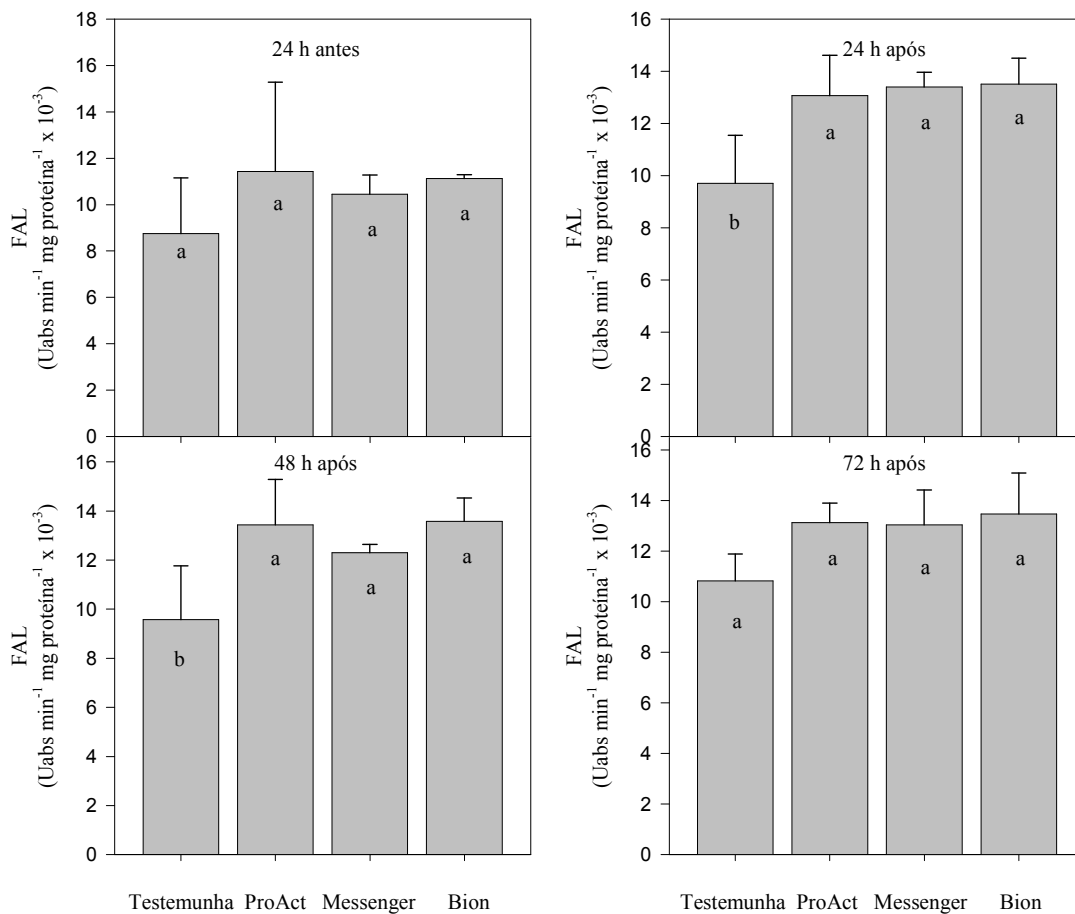
Danner et al. (2008) constaram maior atividade da FAL em frutos de pêssego tratados com harpina e ASM, assim como extratos de patógenos têm apresentado aumentos na atividade da FAL (ORSOMANDO et al., 2003; BROETTO et al., 2005). Maior atividade dessa enzima também foi constatada por Baysal, Turgut e Mao (2005) em plantas de pimenta que receberam aplicação de ASM, sobretudo nas plantas inoculadas com o fungo *Phytophthora capsici*, mostrando que a maior atividade enzimática resultou em incrementos no conteúdo de fenóis totais, bem como na redução dos sintomas causados por este fungo. Maior expressão de genes responsáveis pela ativação da produção de enzimas relacionadas à



defesa, como é o caso da FAL, também é observada após o tratamento com ASM, sobretudo quando o tratamento é seguido da inoculação do patógeno (COOLS; ISHII, 2002). Também no presente trabalho foram observados maiores valores para atividade da FAL, após a inoculação do patógeno *B. cinerea*.



**Figura 09** – Atividade da FAL 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 19,8. UTFPR, 2009.



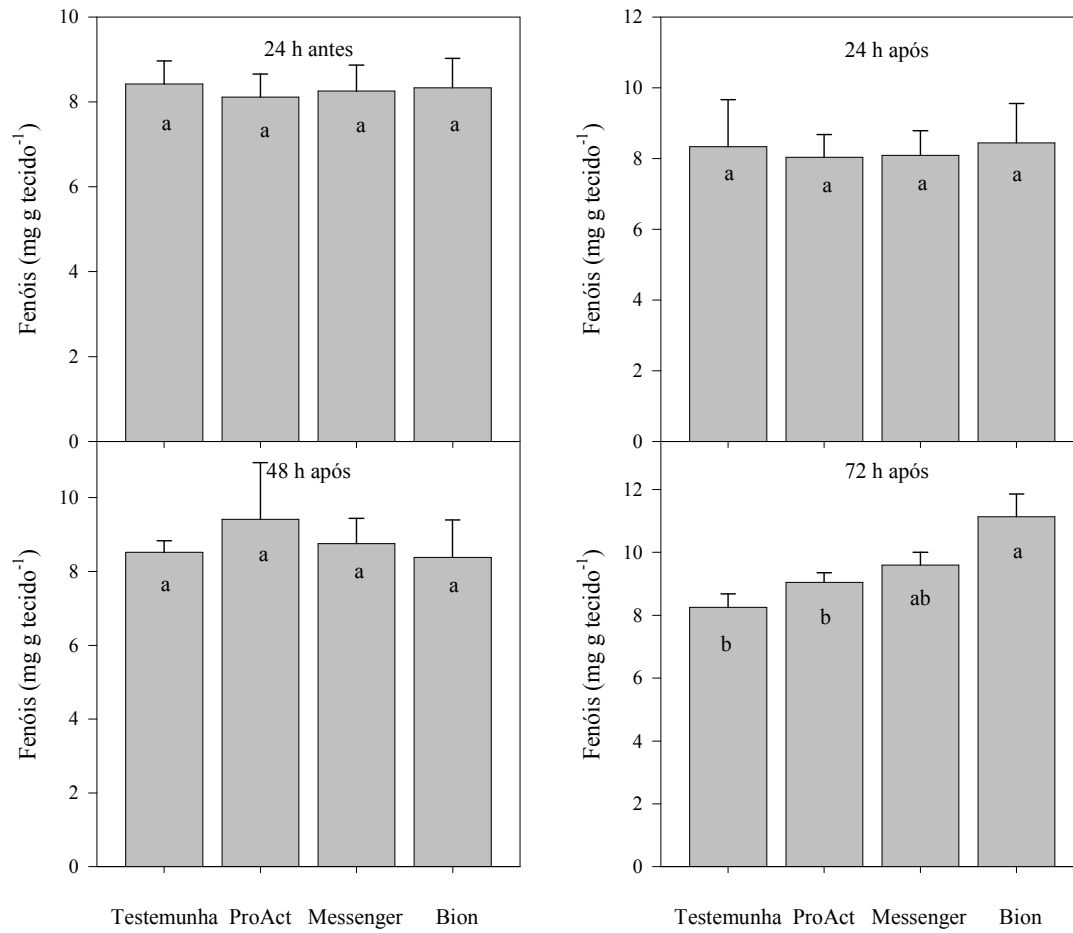
**Figura 10** – Atividade da FAL 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 13,2. UTFPR, 2009.

Analisando as figuras 09 e 10, referentes à primeira e segunda aplicação dos tratamentos, respectivamente, pode-se observar que os valores para atividade da FAL após a primeira aplicação são inferiores aos valores relativos à segunda aplicação dos tratamentos, inclusive para testemunha. Isso indica que a inoculação do fungo promoveu maior ativação de defesas, visto que a inoculação de *B. cinerea* foi realizada somente após a segunda aplicação dos tratamentos.

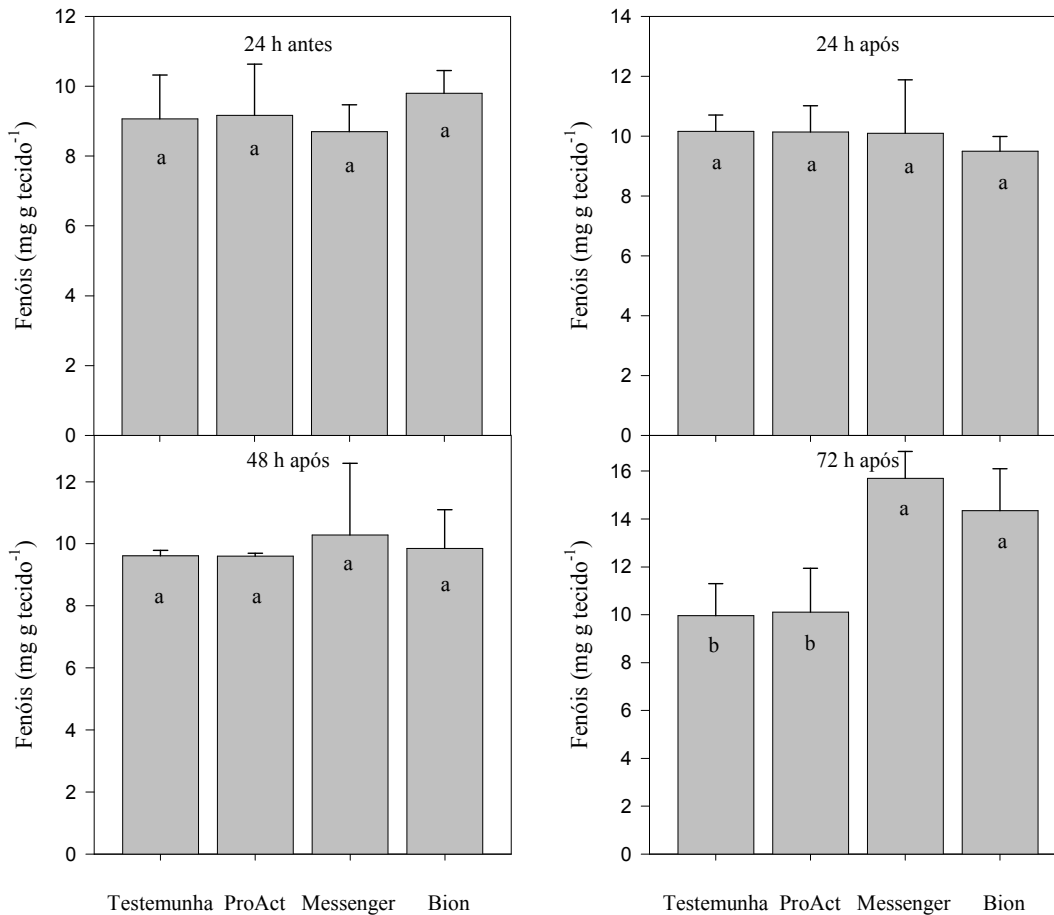
Além disso, pode ter ocorrido efeito cumulativo de duas aplicações, após a segunda aplicação dos tratamentos, uma vez que é possível ocorrer um aumento significativo nas defesas depois de vários dias da eliciação. O tratamento com eliciadores quinze dias antes da colheita de mamão garantiu níveis inferiores de incidência de doenças e contribuiu para redução de podridões pós-colheita (DANTAS et al., 2004). Da mesma forma em batatas, a aplicação de ASM trinta dias antes da colheita foi eficiente contra *Fusarium* nos tubérculos em pós-colheita (BOKSHI; JOBLING, 2000).

A FAL é a enzima chave para produção de diversos compostos do metabolismo secundário, responsáveis pela indução de resistência em plantas, e sua atividade tem sido relacionada ao controle de diversas doenças de plantas (DURRANT; DONG, 2004; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997), conforme os resultados obtidos neste trabalho. Dentre os compostos relacionados à defesa, que são produzidos na rota metabólica mediada pela FAL, estão os compostos fenólicos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Em resposta à maior atividade da FAL, também o conteúdo de fenóis totais apresentou aumento após 72 horas da pulverização dos eliciadores, tanto da primeira quanto da segunda aplicação dos tratamentos; entretanto, apenas os produtos Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup> diferiram de forma significativa da testemunha (Figuras 11 e 12). Em pêssego, maior acúmulo de fenóis totais foi constatado após tratamentos com harpina e ASM nas mesmas dosagens que usamos no experimento 1 do presente trabalho (DANNER et al., 2008). Lin; Ishizaka; Ishii (2009) observaram aumento significativo no conteúdo de compostos fenólicos aos oito e nove dias após a aplicação de ASM em plantas de pepino, que correspondem a um e dois dias após a inoculação do fungo *Colletotrichum orbiculare*. Em plantas de pimenta tratadas com ASM, inoculadas e não inoculadas com *Phytophthora capsici*, também houve aumento significativo na concentração de fenóis totais em comparação à testemunha com e sem inoculação do patógeno. Além disso, maiores incrementos no conteúdo de fenóis totais foram observados nas plantas inoculadas (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005), indicando a maior indução de defesas quando a planta realmente necessita. Esse fato pode ser interessante do ponto de vista do custo/benefício da indução de resistência.



**Figura 11** – Conteúdo de fenóis totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 8,6. UTFPR, 2009.



**Figura 12** – Conteúdo de fenóis totais 24 horas antes, e 24, 48 e 72 horas depois da segunda aplicação dos tratamentos em morango, cultivar Camarosa tratado com ProAct<sup>TM</sup>, Messenger<sup>®</sup> e Bion<sup>®</sup>. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e CV(%) = 12,5. UTFPR, 2009.

Sendo assim, a redução nos índices de incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma, bem como das flores abortadas, do mofo-cinza e dos ácaros, foi intermediada pela aplicação dos eliciadores harpina e ASM, os quais ativaram a rota de resposta para indução de resistência que envolve maior atividade da FAL, a qual possibilitou o acúmulo de compostos fenólicos, conhecidos por seu potencial de defesa contra patógenos, insetos e demais estresses ambientais.

No experimento 2, os tratamentos com diferentes doses de harpina e ASM não diferiram significativamente da testemunha para as variáveis NFC, MFC e MMC de frutos comercializáveis (Tabela 03). Assim como no experimento 1, a produção por planta foi relativamente baixa, em função do curto período de avaliação para essas variáveis, que foi de apenas dois meses. Entretanto, os valores encontrados para a massa média dos frutos comercializáveis, acima de 14 g fruto<sup>-1</sup>, foram muito bons. Verona et al. (2007) encontraram para a cultivar Aromas, massa média de 13,85 g fruto<sup>-1</sup>, no município de Chapecó-SC, onde

esta cultivar apresentou os melhores resultados para o MMC de frutos, comparada a outras cultivares, dentre elas, a Camarosa.

Para a variável porcentagem de frutos podres, em que o fungo *B. cinerea* foi o mais expressivo, apenas as doses mais baixas de harpina e ASM não diferiram da testemunha (Tabela 03).

**Tabela 03** – Número de frutos comercializáveis por planta (NFC), massa dos frutos comercializáveis por planta (MFC), massa média dos frutos comercializáveis (MMC) e sobre a incidência de frutos podres (FP), em morango, cultivar Aromas tratado com ProAct™ e Bion®. UTFPR, 2009.

<b>Tratamento (doses em mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NFC (frut. Planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>MFC (g planta<sup>-1</sup>)</b>	<b>MMC (g fruto<sup>-1</sup>)</b>	<b>FP (%)</b>
Testemunha 0	5,25 a	70,75 a	15,66 a	26,05 a
ProAct™ 100	5,50 a	67,98 a	14,24 a	19,82 ab
ProAct™ 200	5,50 a	70,75 a	14,78 a	17,53 b
ProAct™ 300	5,68 a	70,50 a	14,34 a	17,30 b
Bion® 100	5,18 a	64,95 a	14,55 a	18,80 ab
Bion® 200	6,25 a	77,20 a	14,42 a	15,58 b
Bion® 300	5,90 a	76,23 a	15,06 a	15,63 b
Bion® 400	5,63 a	70,33 a	14,52 a	14,70 b
<b>CV%</b>	<b>15,4</b>	<b>14,6</b>	<b>9,8</b>	<b>18,8</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Os tratamentos não diferiram significativamente quanto à atividade fotossintética 24 horas após a primeira aplicação dos eliciadores, e isso se refletiu na produtividade, a qual também não apresentou diferenças significativas para a variável massa média por tratamento (Tabela 04). Esse resultado discorda com dados obtidos no experimento 1 e por Marchese (2006) em *Atemisia annua*, onde houve aumento na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, depois de 24 horas da aplicação, tanto de harpina, quanto de ASM. O mesmo autor relata que o aumento da fotossíntese não refletiu em aumento de biomassa, provavelmente pelo aumento da respiração que deve ter ocorrido concomitantemente ao aumento da fotossíntese. É preciso ressaltar que no experimento 01, a fotossíntese aumentou significativamente 48 horas após a pulverização com os eliciadores, e no experimento 02 a fotossíntese foi mensurada 24 horas após a pulverização. Esses resultados sugerem que para ocorrer o efeito significativo dos eliciadores (principalmente harpina) na assimilação de CO<sub>2</sub>, é necessário um tempo maior que 24 horas.

**Tabela 04** – Fotossíntese 24 horas antes e 24 horas depois da primeira aplicação dos tratamentos (FT) e massa média de frutos comercializáveis por tratamento (MMF), em morango, cultivar Aromas tratado com ProAct<sup>TM</sup> e Bion<sup>®</sup>. UTFPR, 2009.

Tratamento (doses em mg L <sup>-1</sup> )	FT 24 h antes ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	FT 24 h depois ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	MMF (g tratamento <sup>-1</sup> )
Testemunha 0	17,36 a	16,58 a	1627,6 a
ProAct <sup>TM</sup> 100	18,55 a	17,44 a	1563,3 a
ProAct <sup>TM</sup> 200	17,66 a	17,29 a	1627,7 a
ProAct <sup>TM</sup> 300	17,28 a	16,60 a	1621,8 a
Bion <sup>®</sup> 100	18,48 a	17,69 a	1493,0 a
Bion <sup>®</sup> 200	17,57 a	16,34 a	1775,3 a
Bion <sup>®</sup> 300	18,32 a	16,25 a	1754,2 a
Bion <sup>®</sup> 400	18,16 a	16,93 a	1617,5 a
<b>CV%</b>	<b>5,77</b>	<b>4,85</b>	<b>15,63</b>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. \* não calculado.

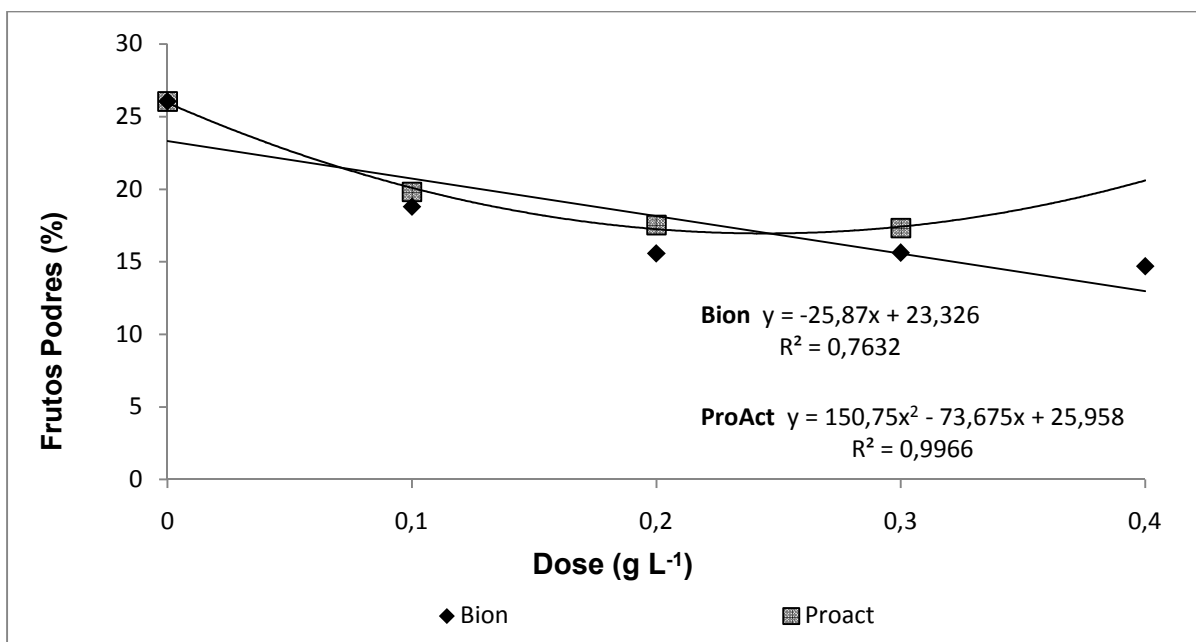
As diferentes doses de harpina agiram reduzindo a porcentagem de frutos podres com regressão quadrática significativa pelo teste F 5% (Figura 13). Da mesma forma, para doses de ASM houve redução para essa variável com regressão linear significativa pelo teste F 5% (Figura 13). Hutcheon, Rocher e Qui (2002) observaram indução de resistência à *Pseudomonas syringae* pv. tomato, mediante a aplicação de harpina em plantas de tomate, em concentração equivalente à menor dose utilizada no presente trabalho (1 mg L<sup>-1</sup> do i.a). Tubajika et al. (2007) também observaram efeito de doses de harpina sobre a redução da incidência de *X. fastidiosa* em videira. Por outro lado, extratos protéicos de diversas bactérias gram-positivas com ação comprovadamente semelhante à proteína harpina, aplicadas em baixas concentrações, não apresentaram efeitos sobre respostas de hipersensibilidade ou ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) em folhas de *Mirabilis jalapa* (ALARCÓN et al., 1998).

Para ASM, foi observada expressiva redução nas lesões causadas por *Erwinia amylovora* em macieiras, em resposta ao aumento nas concentrações de ASM, sendo observada redução já a partir da menor dose (50 mg L<sup>-1</sup> i.a.) que corresponde à menor dose utilizada no presente trabalho; a melhor dose observada em macieira foi de 350 mg L<sup>-1</sup> do i.a., e é muito superior à nossa maior dose, que foi de 200 mg L<sup>-1</sup> do i.a. ou 400 mg L<sup>-1</sup> do produto Bion<sup>®</sup> (MAXSON-STEIN et al., 2002). Essa redução na área lesionada em função da aplicação de ASM em plantas de macieira foi associada ao aumento na expressão de genes relacionados à patogênese, e, ao mesmo tempo, a aplicação do eliciador sobre a bactéria *E.*

*amiloavora in vitro*, não promoveu controle algum, indicando que a ação sobre a doença nas plantas ocorreu exclusivamente pela indução da RSA.

Embora a incidência de frutos podres tenha reduzido em função das doses de harpina, ainda são necessários estudos com doses mais altas deste eliciador em morango, para definir o ponto de máxima eficiência técnica (MET), uma vez que ao calcular este valor, a variável X (tratamentos) ficou fora dos limites de variação, sendo superior à maior dose. Além disso, outros autores têm encontrado resultados significativos com dosagens superiores às usadas no presente estudo (DONG et al., 2004; TUBAJIKA et al., 2007), inclusive nos demais experimentos aqui descritos, em que a dosagem para o produto ProAct™ no experimento 1 foi de 2,5 g L<sup>-1</sup> (25 mg L<sup>-1</sup> do i.a), oito vezes mais que a maior dosagem utilizada no experimento 2 (300 mg L<sup>-1</sup> ou 3 mg L<sup>-1</sup> do i.a), apresentando resultados satisfatórios para o controle de podridões pós-colheita causadas neste caso, principalmente, por *B. cinerea*.

Da mesma forma, podemos concluir que, para ASM, outras dosagens poderiam ser testadas para definir a dose correta para cultura do morango, no controle de *B. cinerea*.



**Figura 13** – Incidência de frutos podres em morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™ - Regressão significativa pelo teste F 5% para equação quadrática com CV%=9,1) e ASM (Bion® - Regressão significativa pelo teste F 5% para equação linear com CV%=22,9). UTFPR, 2009.



### 3.4 CONCLUSÕES

Conclui-se por fim que os eliciadores harpina e ASM apresentam grande potencial para uso em pré-colheita de morango, uma vez que os mesmos reduziram a incidência de enfermidades como mancha-de-dendrofoma, podridão de frutos, flores abortadas e no caso da harpina também a incidência de ácaros, sendo, portanto, uma alternativa interessante para produtores de morango orgânico ou mesmo para serem usados no manejo integrado de pragas e doenças, reduzindo o uso de agrotóxico.

## 4 CAPÍTULO II – ELICIADORES PÓS-COLHEITA

### 4.1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é suscetível a diversas doenças fúngicas e dentre estas, as podridões pós-colheita são de relevante importância econômica, pois tornam os frutos inapropriados à comercialização. Diversas injúrias provocadas nos frutos os tornam mais suscetíveis ao ataque das podridões pós-colheita (DURIGAN; MATTIUZ; DURIGAN, 2005; FISCHER et al., 2007).

Das doenças relacionadas ao morango, em pós-colheita, a principal é a podridão de *Rhizopus* causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* Ehr., o qual forma uma densa massa de micélio branco nos frutos em condições de alta umidade e temperatura (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005) e o mofo-cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinerea*, caracterizado por formar uma massa cinzenta sobre os frutos, tornando-os inapropriados ao consumo (COSTA; VENTURA, 2006).

O controle é normalmente efetuado por meio de fungicidas, principalmente produtos cúpricos que depreciam os frutos quanto ao aspecto, além de deixar residual (TANAKA; BETTI; KIMATI, 2005), apresentando, também, efeito negativo sobre organismos benéficos como abelhas, importantes para a polinização e produção. Esses efeitos negativos podem ser minimizados ou até eliminados com o uso de alguns produtos de maior segurança que vêm apresentando resultados satisfatórios, denominados eliciadores ou indutores de resistência.

A proteína harpina é um eliciador biótico presente em diversas bactérias patogênicas e tem ação confirmada na indução de resistência, além de promover o aumento da taxa assimilatória de CO<sub>2</sub> (MARCHESE, 2006) e o acúmulo de biomassa em algumas plantas (WEI et al., 1992; LESTER; BUBENHEIM; ROCHER, 2002; QUI; CLAYTON, 2002a). Em frutos de pessegueiro tratados com harpina houve redução na área lesionada por *Monilinia fructicola*, estimada em 39,8% para o produto Messenger<sup>®</sup> e 31,5% com o uso do produto ProAct<sup>™</sup>, ambos à base de harpina. Tal redução foi associada ao incremento na atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) (DANNER et al., 2008), enzima chave na síntese de compostos fenólicos de ação antibiótica, além da síntese da lignina, responsável pela maior resistência física dos tecidos.

Outro eliciador sintético, o acibenzolar-S-metil (ASM), funciona como indutor de resistência abiótico de baixa toxicidade para organismos não alvos. O ASM tem apresentado

resposta significativa na indução da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), através da ativação de genes de resistência em diversas espécies (FRIEDRICH et al., 1996; GORLACH et al., 1996; LAWTON et al., 1996; ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005). O ASM foi relacionado à redução da intensidade do mofo-cinzento, causado por *B. cinerea* em frutos de morango (TERRY; JOYCE, 2000; MAZARO et al., 2008).

A literatura brasileira referente ao uso de eliciadores com a cultura do morango é recente, e basicamente restrita a pré-colheita. Além disso, a exigência pelos chamados “food safety” ou alimentos seguros é crescente, sobretudo para grandes importadores, como a União Européia, que exigem garantias sobre a qualidade e segurança dos alimentos durante toda sua cadeia produtiva. E no caso do morango, que apresenta elevados índices de resíduos de agrotóxicos (SESA, 2009), há grande demanda por maiores estudos com uso de produtos mais seguros na área de pós-colheita.

Devido aos entraves ocasionados pelas podridões em pós-colheita na cultura do morango o presente trabalho objetivou testar dois produtos constituídos de proteína harpina (Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup>) e um à base de ASM (ActiGard<sup>®</sup> 50 WG) aplicados em pós-colheita, bem como diferentes doses de harpina (ProAct<sup>™</sup>) e ASM (Bion<sup>®</sup> 500WG) aplicados em pré-colheita, sobre a indução de resistência ao mofo-cinzento causado por *B. cinerea*, em pós-colheita de morango.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR, *Campus* Pato Branco. O experimento 1, foi realizado em outubro de 2008, com morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa adquiridos no município de Palmas/PR, obtidos de plantas sob cultivo orgânico, em estufa plástica e tratadas apenas com Supermagro (produzido no local); o experimento 2, foi conduzido em setembro de 2009, com frutos da cultivar Aromas, obtidos de experimento com doses dos indutores harpina e ASM aplicados em pré-colheita, sendo esses tratamentos avaliados nos frutos em pós-colheita.

O delineamento experimental do experimento 1 foi constituído por um esquema bifatorial (2x4), inteiramente casualizado, com três repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por bandejas plásticas com tampas, cada qual com 12 frutos de

tamanho uniforme (Figura 14A). Os tratamentos foram constituídos por morangos com e sem ferimentos, tratados com três eliciadores, dois deles à base de proteína harpina e um à base de ASM, considerando-se como testemunha a aplicação de água destilada e esterilizada. O croqui pode ser visualizado no APÊNDICE C.

Os frutos foram colhidos no ponto de maturação e transportados para o laboratório em caixas de papelão, selecionando-se aqueles mais uniformes em relação ao tamanho, firmeza, cor e ausência de injúrias ou doenças. Os frutos passaram por uma desinfecção, por meio da imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,1% cloro ativo) durante 30 segundos, procedendo-se à lavagem em água destilada e esterilizada, e secagem sob temperatura ambiente durante 10 minutos.



**Figura 14** – Condução dos experimentos 1 (A) e 2 (B) em pós-colheita. UTFPR, 2008/2009.

Os frutos foram divididos em dois grupos: um, com ferimento mecânico realizado por perfurador de 0,5 mm de diâmetro, na porção equatorial com duas inserções em faces opostas do fruto, a uma profundidade de 3 mm; e outro, sem ferimento.

Os tratamentos foram aplicados em seguida, usando-se a proteína harpina na dosagem de 80 mg L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo dos produtos comerciais Messenger<sup>®</sup> (3% do i.a.) e ProAct<sup>™</sup> (1% do i.a.), ambos obtidos da empresa Eden Bioscience, e o produto comercial ActiGard<sup>®</sup> 50 WG (50% do i.a.) à base de ASM, obtido da empresa Syngenta, utilizando a dosagem de 5 mg do i.a. mL<sup>-1</sup>. A testemunha foi pulverizada com água destilada e esterilizada. As pulverizações foram realizadas com auxílio de borrifadores, utilizando-se um para cada tratamento, com 1 mL fruto<sup>-1</sup> da solução de cada produto.

Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas forradas com papel-toalha umedecido; cada fruto foi colocado sobre uma tampa de garrafa pet (30 mm de diâmetro e 10

mm de altura) evitando, desta forma, o contato direto com a umidade. As bandejas permaneceram no laboratório sob temperatura ambiente (média 22°C).

Após 12 horas da aplicação dos eliciadores, foi procedida a inoculação nos frutos com 1 mL da suspensão de conídios do fungo *B. cinerea*, na concentração ajustada para  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Os inóculos de ambos os experimentos em pós-colheita foram isolados de frutos doentes e cultivados em meio de cultura BDA mantido em estufa incubadora tipo B.O.D. a 25° C e fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. Os conídios foram retirados através de pincel úmido e diluídos em água destilada efetuando-se, posteriormente, sua contagem para ajuste da suspensão com auxílio da câmara de Neubauer. A contagem foi feita em quatro quadrantes e os dados obtidos, submetidos à seguinte equação:

$$N^{\circ} \text{ de conídios mL}^{-1} = (N^{\circ} \text{ total de conídios} / N^{\circ} \text{ de quadrantes contados}) \times 10000.$$

Os frutos permaneceram sob condições de temperatura ambiente (média 22°C) e, após 48 horas (assim que os sintomas de podridão manifestaram-se), foram realizadas as avaliações de incidência, área lesionada e firmeza de polpa. Posteriormente, foram coletadas amostras de tecido retiradas de áreas adjacentes às lesões, as quais foram armazenadas em nitrogênio líquido (- 180° C) para a determinação da atividade da FAL.

No experimento 2 foi avaliado o efeito dos tratamentos aplicados em pré-colheita sobre a indução de resistência dos frutos na pós-colheita. Os frutos, provenientes de experimento conduzido em canteiros sob estufa no delineamento experimental de blocos casualizados (8x4) com oito tratamentos e quatro repetições, foram colhidos 24 horas após a quarta aplicação dos tratamentos (75 dias após o plantio), constituídos por três doses de harpina (100; 200 e 300 mg L<sup>-1</sup> de ProAct™/Eden Bioscience 1% i.a.) e quatro doses de ASM (100; 200; 300 e 400 mg L<sup>-1</sup> de Bion® 500WG/Syngenta, 50% i.a.), além de um tratamento testemunha (água destilada). O croqui pode ser visualizado no APÊNDICE D.

Os frutos colhidos foram devidamente identificados com referência ao tratamento recebido em campo e levados ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR, onde foram lavados em solução de hipoclorito de sódio (5% cloro ativo) durante 30 segundos e enxaguados em água destilada. O experimento pós-colheita foi implantado no dia 15/09/2009, em bandejas plásticas, cada qual com 6 frutos, constituindo uma unidade experimental. O delineamento foi o inteiramente casualizado, mantendo-se os 8 tratamentos realizados a campo, porém, com três repetições (8x3) por falta de frutos oriundos do ensaio em pré-colheita (Figura 14B). As bandejas foram forradas com papel-toalha umedecido e os frutos alocados sobre tampas de garrafa pet. Em seguida, foi realizada a inoculação dos frutos

com 1 mL fruto<sup>-1</sup> da solução de conídios do fungo *B. cinerea* na concentração de 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, com auxílio de borrifadores. Os frutos permaneceram sob temperatura ambiente (média 22°C) e passadas 96 horas da inoculação do fungo (assim que os sintomas de podridão manifestaram-se), foram avaliados quanto à área lesionada e firmeza de polpa.

A área lesionada foi determinada com auxílio de paquímetro digital, medindo-se quatro raios perpendiculares entre si, a partir do centro de cada lesão, obtendo-se um raio médio, medida usada para o cálculo de área da circunferência ( $A = \pi r^2$ ).

A firmeza de polpa foi quantificada por meio de um Penetrômetro TR (Modelo Fruit Test 327), com ponteira de 8 mm e os resultados expressos em Newtons (N).

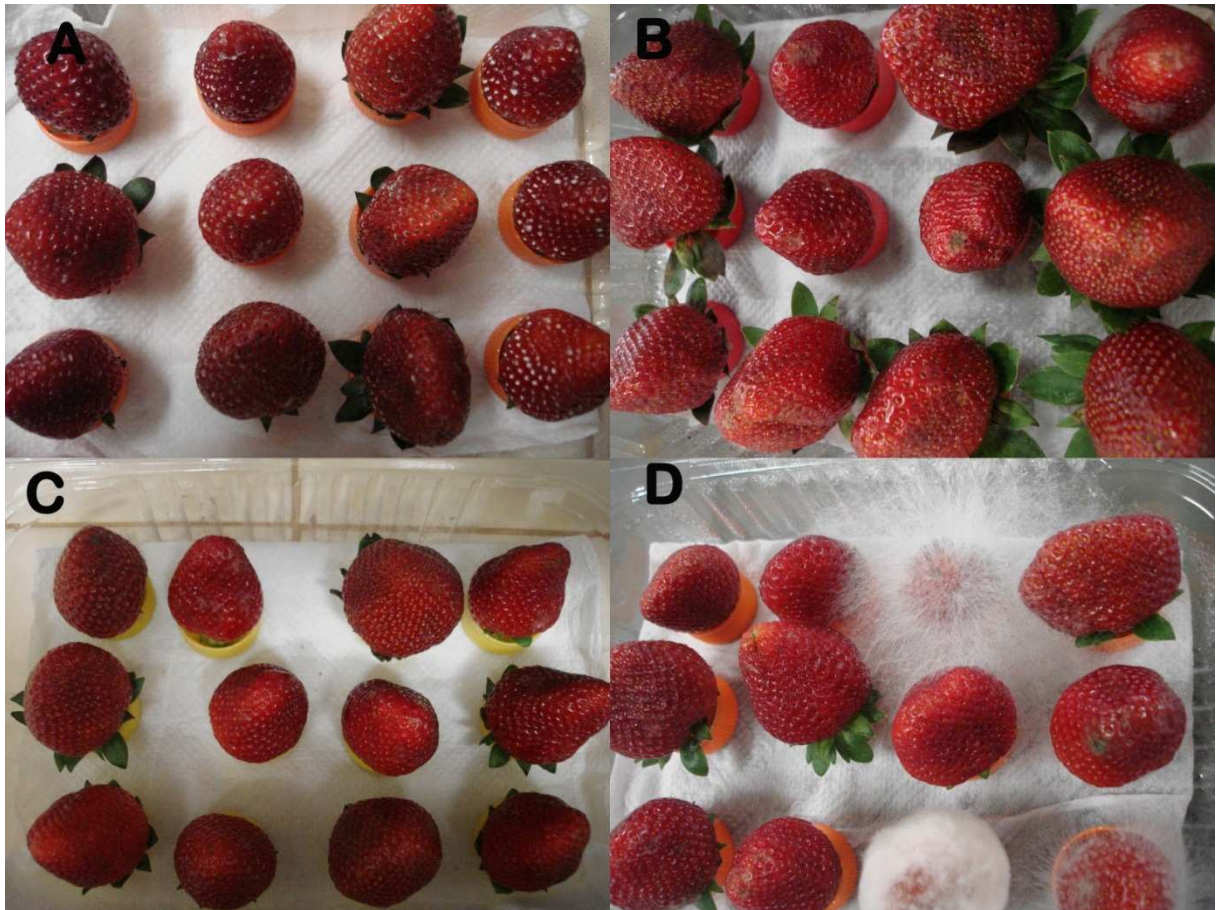
A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pela metodologia descrita por Bradford (1976), com soro-albumina bovina como padrão. A quantificação da atividade da FAL foi realizada por meio de metodologia descrita por Rodrigues, Bezerra Neto e Coelho (2006).

Os dados foram submetidos à análise de variância no programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2002) e a comparação de médias das variáveis dependentes, através do teste de Tukey a  $P \leq 0,05$  de probabilidade de erro para os dados do primeiro experimento e de análise de regressão para os dados do segundo experimento. Os dados referentes à área lesionada do experimento 4 foram transformados para arco seno ( $\sqrt{X/100}$ ).

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 3 foi observada presença de dois importantes fungos causadores de podridões nos frutos em pós-colheita, foram eles *Rhizopus stolonifer* e *B. cinerea*, este último apresentou na fase inicial de colonização uma coloração mais clara próxima ao branco (Figura 15). A incidência de podridões foi de 97,2% no tratamento testemunha e reduziu para 51,4% nos frutos que receberam o tratamento com Messenger<sup>®</sup> e 63,9% nos tratamentos ProAct<sup>™</sup> e Actigard<sup>®</sup> (Tabela 05). Os frutos colonizados pelo fungo *R. stolonifer*, embora não tenham sido inoculados com o mesmo, estavam completamente tomados no momento da avaliação, sendo a área lesionada avaliada apenas para *B. cinerea*, o qual foi previamente inoculado. A

redução na incidência de podridões pós-colheita em morango com o uso de eliciadores também foi observada por Mazaró (2007), dentre eles o ASM.



**Figura 15** – Incidência de podridões em frutos de morango tratados com Actigard® (A), ProAct™ (B) e Messenger® (C), comparados à Testemunha (D). UTFPR, 2008.

**Tabela 05.** Área lesionada por *Botrytis cinerea* em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa tratados, em pós-colheita, com Actigard®, Messenger® e ProAct™ e inoculados com *B. cinerea*. UTFPR, 2008.

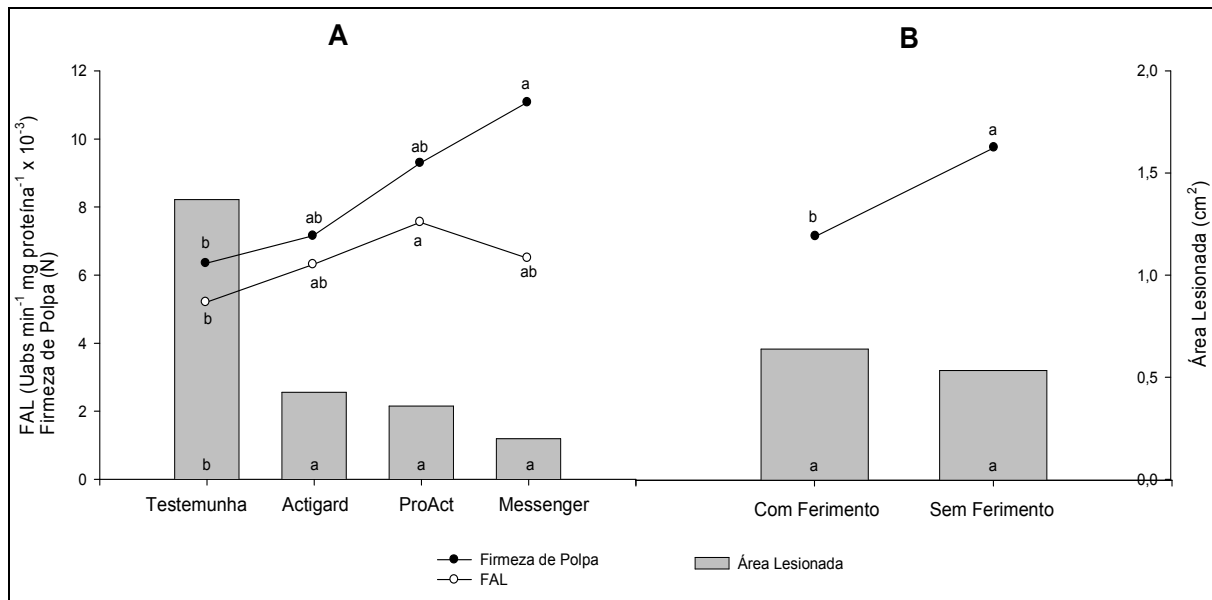
Produto	Incidência de Podridões (%)	Área Lesionada (cm <sup>2</sup> )	Eficiência de controle (%)
Testemunha	97,2 a	1,37 b	-*
ProAct™	63,9 b	0,36 a	67,36 a
Messenger®	51,4 b	0,20 a	81,85 a
Actigard®	63,9 b	0,43 a	68,85 a
<b>Com Ferimento</b>	<b>70,8 a</b>	<b>0,64 a</b>	<b>84,69 a</b>
<b>Sem Ferimento</b>	<b>67,3 a</b>	<b>0,54 a</b>	<b>60,68 a</b>
<b>CV %</b>	<b>23,76</b>	<b>35,16</b>	<b>26,76</b>

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ). CV = Coeficiente de Variação.

\* Não calculado.

Os frutos com ferimento mecânico não apresentaram diferença significativa em relação aos frutos sadios para a variável área lesionada e para atividade da FAL; entretanto, para a variável firmeza de polpa, os frutos sem ferimento apresentaram maior firmeza quando comparados aos demais (Figura 16B), provavelmente porque os frutos feridos apresentam maior degradação das paredes. Segundo Mattiuz e Durigan (2001), injúrias mecânicas em goiabeira provocaram o extravasamento do suco celular em função dos ferimentos, expondo a área ferida à ação enzimática e oxidação, afetando desta forma, a firmeza de polpa dos frutos.

Para a variável área lesionada, houve redução significativa ( $p \leq 0,01$ ) da mesma para os três eliciadores em relação à testemunha (Figura 16A), sendo que o Messenger<sup>®</sup> apresentou menor área lesionada, seguido de ProAct<sup>TM</sup> e Actigard<sup>®</sup>, os quais não diferiram estatisticamente entre si.



**Figura 16** - Área lesionada por *Botrytis cinerea*; firmeza de polpa (N) e atividade enzimática da FAL em frutos de morango, cultivar Camarosa, tratados com Messenger<sup>®</sup>, ProAct<sup>TM</sup> e Actigard<sup>®</sup> (A). Área lesionada por *B. cinerea* e firmeza de polpa (N) em frutos de morango com e sem ferimento (B). Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). UTFPR, 2008.

Houve uma eficiência de controle de 86,09 %, 75,01 % e 65,45 %, respectivamente, para os três produtos em comparação à testemunha (Tabela 05). Corroborando com os resultados desta investigação, Akbudak et al. (2006) verificaram menor incidência de frutos podres de pimentão tratados com a proteína harpina e desafiados com *B. cinerea*, apresentando uma redução significativa nos frutos de descarte. O tratamento de frutos de cereja em pós-colheita com harpina reduziu a incidência de podridões nos frutos em 51% (QUI; CLAYTON, 2002b). Nesse mesmo trabalho foram observadas, com o uso de harpina,



reduções significativas na incidência de *B. cinerea*, em frutos de laranja, tomate, uva e maçã, com valores de 47%, 44%, 43% e 72%, respectivamente. Capdeville et al. (2008) relatam o efeito da harpina sobre a colonização e esporulação de *Penicillium expansum* em frutos de maçã que foi atrasada em 24 e 72 horas, respectivamente, em relação à testemunha, estando tal fenômeno relacionado ao aumento de tanino nos vacúolos e deposição de compostos estruturais de parede nas células da epiderme dos frutos tratados.

A pulverização com ASM reduziu as infecções causadas por *B. cinerea* em pós-colheita de morangos de forma efetiva, tanto quanto à aplicação de fungicidas (MAZARO et al., 2008). Em maçãs, a aplicação de ASM não reduziu a doença conhecida por “podridão da Gala” causada por *P. expansum* durante sete meses de armazenamento a - 0,5 °C, entretanto, induziu à maior produção da fitoalexina *trans-resveratrol* (SAUTTER et al., 2008). Ainda com maçãs, em outro estudo, observou-se a redução de 41,9% da podridão causada por *P. expansum* com a aplicação de ASM combinado com o agente de biocontrole BIO 126 (*Metschnikowia pulcherrima*), enquanto que para *B. cinerea* houve redução de 14,8% no diâmetro das lesões, em frutos tratados apenas com ASM (SPADARO; GARIBALDI; GULLINO, 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho para a variável área lesionada indicam que houve indução de resistência sistêmica para todos os eliciadores utilizados, com um provável acúmulo do ácido salicílico (AS) nos tecidos, devido ao aumento da atividade da FAL (Figura 16A e Tabela 06). O AS é conhecido por ativar sinais sistêmicos responsáveis pela RSA, desencadeando o processo de defesa com ativação da resposta de hipersensibilidade, bem como a produção de compostos antimicrobianos (DURRANT; DONG, 2004). No caso do ASM, esta é uma molécula semelhante ao AS, e atua como sinalizador, mimetizando a ação deste.

Na avaliação referente à firmeza de polpa, foram constatados valores maiores de firmeza nos frutos tratados com os eliciadores (Tabela 06), mantendo-se a tendência observada para área lesionada, demonstrando que o ataque gradativo da doença afetou a firmeza dos frutos (Figura 16A).

A atividade da FAL foi superior nos tratamentos submetidos à pulverização com os eliciadores, comparados à testemunha. Todavia, apenas o ProAct™ diferiu de forma significativa ( $P \leq 0,01$ ) da testemunha (Tabela 06). Assim, foi possível observar no tratamento com ProAct™ maior atividade da FAL, seguido de Actigard® e Messenger®, quando comparados a testemunha. A redução da área lesionada por *B. cinerea* está relacionada à maior atividade da FAL (Figura 16A). Tal evento deve-se ao pré-condicionamento dos

agentes de indução sobre os frutos que mantêm seu sistema de defesa ativo mesmo após a colheita e que são acionados mais fortemente após serem desafiados pelo fitopatógeno (GOELLNER; CONRATH, 2008). Stadnik; Buchenauer (2000) observaram um incremento de 78 % na atividade da FAL em folhas de trigo submetidas ao tratamento com ASM e desafiadas com *Blumeria graminis* 15 dias após a aplicação dos tratamentos, quando comparadas ao tratamento controle, sem a aplicação de ASM, formando substâncias importantes para a defesa contra patógenos. Broetto et al. (2005), estudando o efeito eliciador da parede celular hidrolisada do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* em diferentes concentrações sobre cultura de células de feijão, observaram aumento da atividade FAL em quatro cultivares testadas.

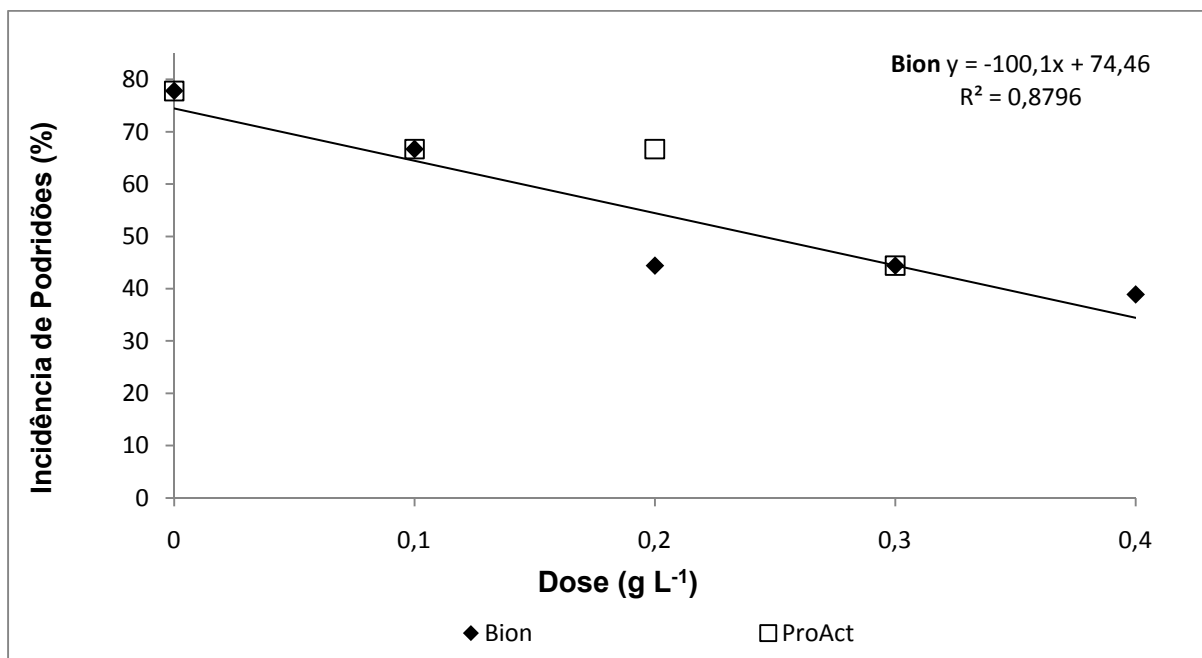
**Tabela 06.** Firmeza de polpa e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa tratados, em pós-colheita, com Actigard<sup>®</sup>, Messenger<sup>®</sup> e ProAct<sup>™</sup> e inoculados com *Botrytis cinerea*. UTFPR, 2008.

Produto	Firmeza de Polpa (N)	FAL(Uabs min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> x 10 <sup>-3</sup> )
Testemunha	6,35 b	5,54 b
ProAct <sup>™</sup>	9,28 ab	7,57 a
Messenger <sup>®</sup>	11,07 a	6,17 ab
Actigard <sup>®</sup>	7,15 ab	6,24 ab
<b>Com Ferimento</b>	<b>7,16 b</b>	<b>6,21 a</b>
<b>Sem Ferimento</b>	<b>9,76 a</b>	<b>6,55 a</b>
<b>CV %</b>	<b>31,5</b>	<b>13,6</b>

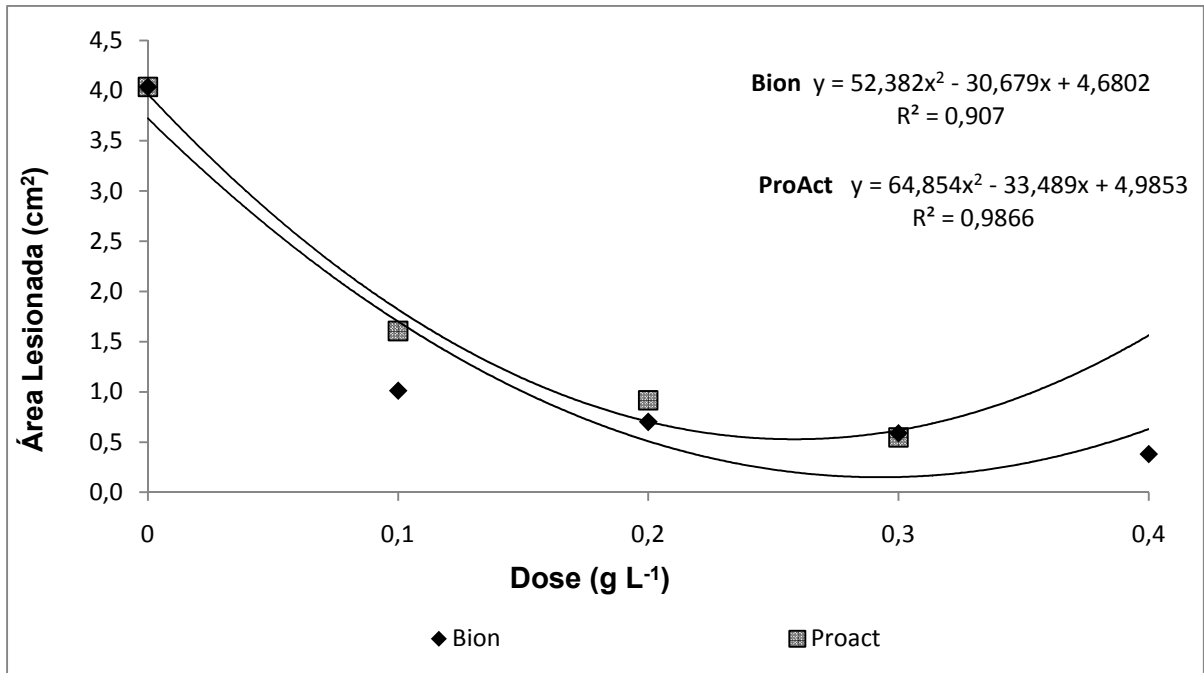
Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ). CV = Coeficiente de Variação.

No experimento 4, em pós-colheita, avaliou-se o efeito de diferentes dosagens de harpina e ASM aplicados em pré-colheita sobre a incidência de podridões, área lesionada e a firmeza de polpa dos frutos em pós-colheita. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para incidência de podridões em função de que o número de frutos avaliados foi bastante reduzido. Entretanto, para o produto Bion<sup>®</sup> houve significância para regressão linear para incidência de podridões, tendo sido observada apenas a presença do fungo *B. cinerea* (Figura 17). Ambos os produtos ProAct<sup>™</sup> e Bion<sup>®</sup> apresentaram redução significativa da área lesionada por *B. cinerea* em todas as dosagens testadas e não foi constatada presença de outros microorganismos causadores de podridões pós-colheita (Figura 18). Cao; Jiang (2006), estudando o efeito da aplicação de ASM em plantas de pera, durante o

desenvolvimento dos frutos, com inoculação dos fungos após a colheita e esterilização dos mesmos, também observaram a redução da área lesionada de 42,7 e 23,4% para *P. expansum* e *Alternaria alternata*, respectivamente. Os autores sugerem ainda, que a redução das infecções esteja diretamente relacionada ao aumento da atividade de enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa da planta, como a FAL, que foi incrementada em 84,3% nos frutos de pera tratados com ASM, em comparação à testemunha (água destilada), tendo efeito direto na produção de fitoalexinas e compostos fenólicos como a lignina, além das enzimas responsáveis pela produção das proteínas-RP, como as quitinases e  $\beta$ -1-3-glucanases. Mazaro et al. (2008), após 20 aplicações de ASM em pré-colheita de morango com inoculação de *B. cinerea* em pré e pós-colheita, observaram uma redução na incidência de podridões em pós-colheita, que passou de 57,5% no tratamento-testemunha, para 35% com o uso de ASM na concentração de 0,0025%, a qual é muito inferior à menor dose de ASM (100 mg L<sup>-1</sup> de Bion<sup>®</sup> ou 5% i.a) utilizada no presente trabalho, onde observa-se uma redução de 72,7% na área lesionada por *B. cinerea* com apenas quatro aplicações. Os mesmos autores sugerem, ainda, que a redução na ocorrência de podridões pós-colheita, em morango, pelo ASM pode estar relacionada à expressão de proteínas-RP que hidrolisam os polímeros de quitina e glucana da parede celular do fungo.



**Figura 17** – Incidência de podridões em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com ASM (Bion<sup>®</sup> - Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação linear com CV%=25) e harpina (ProAct<sup>TM</sup> - Regressão não significativa pelo teste F5% com CV%=28,2). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.



**Figura 18** - Área lesionada por *B. cinerea* em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™) e ASM (Bion®). Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação quadrática para ambos os produtos (CV%=23,6 Bion® e CV%=8,2 ProAct™). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.

Houve redução de 84,9%, 82,4% e 89,9% da área lesionada para as dosagens de 300 mg L⁻¹ de ProAct™ e de Bion®, e 400 mg L⁻¹ de Bion®, respectivamente, sendo estas as maiores dosagens e as mais eficientes no controle da doença, pois não diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 07). Em experimento com melões, as doses mais altas de ASM (25 e 50 g ha⁻¹, que são equivalentes às doses de 100 e 200 mg L⁻¹ de Bion® do presente trabalho), aplicados nas plantas a campo apresentaram eficiência de controle de 65,6% e 65%, respectivamente, sobre a mancha-aquosa do meloeiro (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) em relação à testemunha (SALES JUNIOR et al., 2007), semelhante aos resultados obtidos no presente experimento, em que as doses correspondentes (100 e 200 mg L⁻¹ de Bion®) apresentaram uma eficiência de controle de 72,7% e 78,3%, respectivamente (Tabela 07).

**Tabela 07.** Área lesionada por *Botrytis cinerea*, eficiência de controle e firmeza de polpa em frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Aromas tratados, em pré-colheita, com diferentes doses de Bion<sup>®</sup> e ProAct<sup>TM</sup> e inoculados com *B. cinerea*. UTFPR, 2009.

Tratamento (mg L <sup>-1</sup> )	Área Lesionada (cm <sup>2</sup> )	Eficiência de controle (%)	Firmeza Polpa (N)
Testemunha 0	4,04 a	- *	9,9 b
ProAct <sup>TM</sup> 100	1,61 b	60,19 a	14,9 ab
ProAct <sup>TM</sup> 200	0,92 bc	77,29 a	19,2 a
ProAct <sup>TM</sup> 300	0,55 bc	86,46 a	17,2 a
Bion <sup>®</sup> 100	1,01 bc	74,98 a	17,1 a
Bion <sup>®</sup> 200	0,70 bc	82,66 a	17,6 a
Bion <sup>®</sup> 300	0,59 bc	85,46 a	17,4 a
Bion <sup>®</sup> 400	0,38 c	90,59 a	15,6 ab
<b>CV%</b>	<b>20,22</b>	<b>18,38</b>	<b>13,7</b>

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ). CV = Coeficiente de Variação.

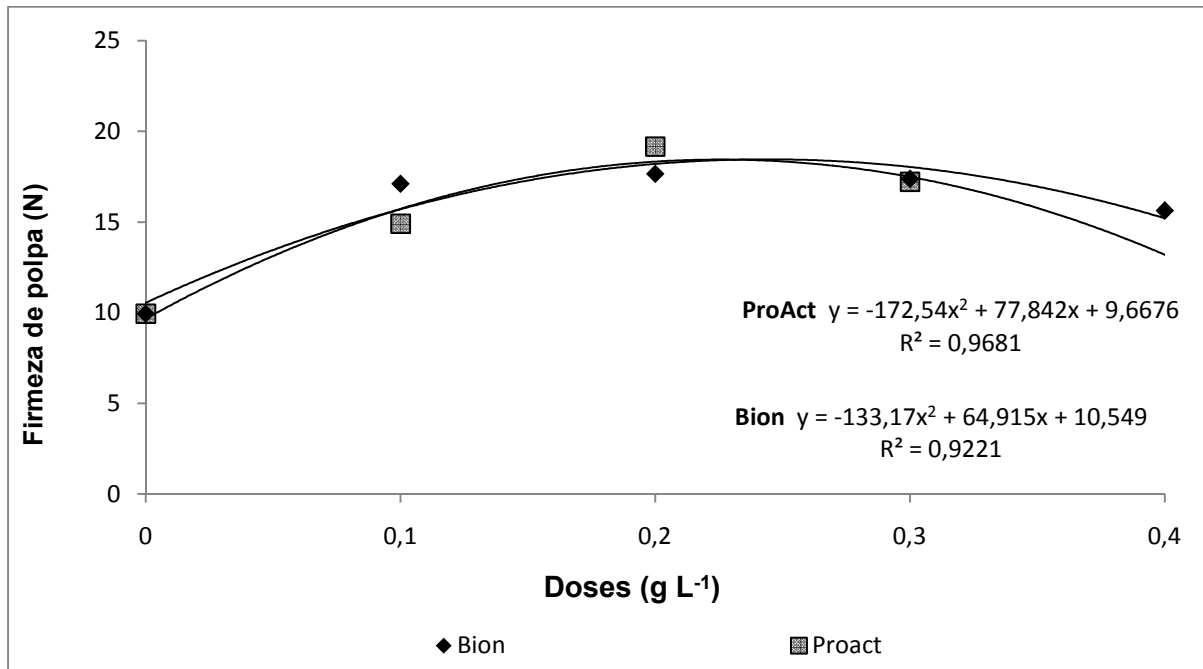
\*Não calculado.

Poucos são os dados correspondentes à proteína harpina, aplicada em pré-colheita em diferentes doses, e os efeitos avaliados em pós-colheita de morango, para área lesionada. Entretanto, Tubajika et al. (2007) observaram em videiras tratadas com diferentes doses de harpina, redução de 26%, 63% e 74% para as dosagens de 160, 320 e 480 mg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, da injúria causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, porém, estas dosagens são muito superiores àquelas utilizadas neste experimento, onde a maior dose corresponde a 7,5 g ha<sup>-1</sup> do i.a. Qui; Clayton (2002b) verificaram que o tratamento de cerejeiras com harpina, em pré e pós-colheita combinadas, permitiu redução de 75 % na incidência de doenças de ocorrência natural nos frutos.

Nesse sentido, fica evidenciada a atuação dos eliciadores na redução da podridão pós-colheita causada por *B. cinerea*, mesmo aplicados em pré-colheita, sendo que tal efeito pode estar relacionado à ativação de múltiplas respostas de defesa, dentre elas, a ativação de enzimas associadas à tolerância ao estresse oxidativo, desencadeando a produção de metabólitos secundários como as fitoalexinas e a síntese de um grupo de proteínas-RP (LAWRENCE et. al., 2000).

Para a variável firmeza de polpa, como no experimento 1 deste capítulo, houve no experimento 2 um aumento da firmeza dos frutos com a aplicação dos eliciadores, caracterizando um efeito dos produtos aplicados na pré-colheita sobre os frutos depois de colhidos, aumentando significativamente a firmeza da polpa conforme o aumento das doses

(Figura 19). Para ambos os produtos, ProAct™ e Bion®, a dose de 200 mg L<sup>-1</sup> apresentou o melhor resultado referente à variável firmeza de polpa (Tabela 07).



**Figura 19** - Firmeza de polpa (N) em frutos de morango, cultivar Aromas tratados com harpina (ProAct™) e ASM (Bion®). Regressão significativa pelo teste F a 5% para equação quadrática para ambos os produtos (CV%=14,8 Bion® e CV%=14 ProAct™). UTFPR, 2009.. UTFPR, 2009.

Resultados semelhantes foram obtidos por Mazaró et al. (2008), com o uso de quitosana, um polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina e de ação na indução de resistência, a qual promoveu o aumento da firmeza de polpa de morangos em pós-colheita à medida que se aumentou a concentração do eliciador. Esta maior firmeza observada nos frutos tratados com eliciadores pode estar relacionada, tanto ao aumento de firmeza pela produção de fenóis sintetizados a partir da ação da FAL, quanto à redução de firmeza decorrente da degradação oxidativa provocada pelas lesões de *B. cinerea* na testemunha, uma vez que não se tem um comparativo com a firmeza dos frutos antes da aplicação dos tratamentos, bem como da inoculação do fungo, visto que esta não foi quantificada. Em cultura de calos de *Linun austriacum*, a aplicação de eliciadores promotores da atividade da FAL aumentou significativamente a biossíntese de ligninas (VARDAPETYAN et al., 2003).

Fazendo-se uma breve comparação entre os dois experimentos realizados em pós-colheita, pôde-se constatar que no experimento 3, com frutos da cultivar Camarosa obtidos de produtor orgânico onde o tratamento principal foi a aplicação, nas plantas, do composto Supermagro de produção caseira, a avaliação das podridões iniciou às 48 horas após a implantação do experimento com alta incidência de podridões, inclusive de *R. stolonifer* que

não havia sido previamente inoculado, enquanto no experimento 4, em que os frutos da cultivar Aromas haviam recebido quatro aplicações com os tratamentos eliciadores em pré-colheita, o início da avaliação ocorreu às 96 horas após a implantação do experimento e apenas o fungo *B. cinerea* pôde ser observado. Este fato revela a importância da aplicação destes eliciadores ainda em pré-colheita, uma vez que o início dos sintomas de podridões ocorreu com o dobro de tempo nos frutos tratados em pré-colheita com ASM e harpina, embora também possa haver um efeito de variedades, sendo, portanto, a cultivar Camarosa mais susceptível a podridões em pós-colheita.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo indicam a potencialidade dos eliciadores aqui testados como indutores de resistência em pós-colheita de morango, podendo ser um recurso importante no manejo pós-colheita para esta cultura, sobretudo por se tratar de produtos de baixa toxicidade, e os morangos apresentarem grande fragilidade ao serem manuseados e transportados. Entretanto, há necessidade de maiores estudos acerca de eliciadores relacionados a outros patógenos, a outras condições ambientais e variedades, para que se possa recomendá-los com maior segurança.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indutores de resistência, proteína harpina e acibenzolar-S-metil, demonstraram em todos os experimentos realizados, uma efetiva atividade na indução de resistência contra o mofo-cinza, causado pelo fungo *B. cinerea* nos frutos, tanto nas aplicações realizadas em pré, quanto em pós-colheita, inclusive com efeito de doses sobre esse parâmetro. A maior atividade da FAL nas plantas possibilitou maior acúmulo de fenóis totais, conhecidos por sua ação antimicrobiana, importante mecanismo da RSA. Sendo esse, portanto, um dos principais fatores envolvidos na indução de resistência observada para cultura do morango.

Além da indução de resistência contra *B. cinerea*, observou-se efeito positivo da harpina e ASM sobre a redução da incidência e severidade da mancha-de-dendrofoma e número de flores abortadas, e, no caso da harpina, ainda houve efeito na redução da incidência de ácaros, indicando que este eliciador atua não apenas contra patógenos, mas também contra herbivoria, como citam diversos estudos.

Uma maior taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, e indiretamente, maior atividade fotossintética foi observada nos tratamentos com harpina, que também é conhecida como promotora do acúmulo de biomassa. No presente trabalho, essa maior taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> foi relacionada à manutenção de uma boa sanidade das plantas e, conseqüentemente, resultando em maior número de frutos por planta. Porém, não afetou a massa dos frutos comercializáveis, tanto nos testes com diferentes produtos, quanto nos testes com doses.

Sendo assim, consideramos que os eliciadores testados, sobretudo a harpina, apresentam excelente potencial na indução de resistência, com boas possibilidades de serem levados a campo para o manejo de doenças e até mesmo de herbivoria em morango, cultura conhecida pelos altos índices de agrotóxicos demandados para que se mantenha uma produtividade economicamente viável. Esses eliciadores podem, ainda, ser utilizados em programas de manejo integrado de pragas e doenças, ou cultivos orgânicos, pois não apresentam toxicidade e nem risco de resistência por parte dos agentes patogênicos, visto que agem no metabolismo da planta e não diretamente sobre estes organismos. Finalmente, consideramos que maiores estudos são necessários quanto a dosagens, uma vez que não obtivemos uma recomendação conclusiva, como também, quanto a outros agentes infestantes da cultura estudada, visto que verificamos possibilidades de indução de resistência contra herbivoria.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 283-298, 1998.

AKBUDAK, N.; TEZCAN, H.; AKBUDAK, B.; SENIZ, V. The effect of harpin protein on plant growth parameters, leaf chlorophyll, leaf colour and percentage rotten fruit of pepper plants inoculated with *Botrytis cinerea*. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 2, p. 107–112, 2006.

ALARCÓN, C.; ASTRO, J.; MUÑOZ, F.; ARCE-JOHNSON, P.; DELGADO, J. Protein(s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. **Phytopathology**, v. 88, n. 4, p. 306-310, 1998.

ALMEIDA, D. P. F. **Manual de culturas hortícolas: Rosáceas – morango**. Volume II. Lisboa: Editorial Presença, 2006. 360 p.

ALMEIDA, V. E. S. de; CARNEIRO, F. F.; VILELA, N. J. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para promoção da saúde. **Tempus. Actas em Saúde Coletiva**, v.4, n.4, p.84-99, 2009.

AMES, B. N.; GOLD, L. S.; WILET, W. C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A. v. 92, n. 12, p. 5258-5265, 1995.

ANTUNES, L. E. C. **Situação da produção integrada de morango (PIMo) no Brasil**. In: ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2006, Pelotas. **Documentos (167)**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. v. 1, p. 101-104.

\_\_\_\_\_; REISSER JUNIOR, C.. Produção de morangos. **Jornal da fruta**, v. 15, n. 191, p. 22-24, 2007.

ANTUNES, O. T; CALVETE, E. O; ROCHA, H. C.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D.; RIVA, E.; MARAN, R. E. Produção de cultivares de morangueiro polinizadas pela abelha jataí em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 094-099, 2007.

ARKATEN, A. **Produção de morango cresce no Paraná**. Disponível em: <http://malletcidade.com/noticiaexpor.php?noticia=64>. Acesso em: março de 2010.

ASSIS, J. S.; MALDONADO, R.; MUÑOZ, T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, n. 1, p. 33–39, 2001.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P.T.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

BAYSAL, Ö.; TURGUT, C.; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 4, p. 599-604, 2005.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytology**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KÖHL, J. The role of petals in development of grey mould in strawberries. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 76-83, 2003.

BOKSHI, A.; JOBLING, J. Enhancing the natural disease resistance of potatoes. **Good Fruit and Vegetables Magazine**, v. 11, n.6, p. 46-47, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRENT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la?**. 2 ed. Reino Unido: Global Crop Protection Federation, 1999.

BROETTO, F.; MARCHESE, J.A.; LEONARDO, M.; REGINA, M. Fungal elicitor-mediated changes in polyamine content, phenylalanine-ammonia lyase and peroxidase activities in bean cell culture. **General Applied Plant Physiology**, v. 31, n. 3-4, p. 235-246, 2005.

BURKETOVÁ, L.; STILLEROVA, K.; FELTLOVÁ, M. Immunohistological localization of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, n. 1, p. 47-54, 2003.

CALEGARIO, F. F. **Cuidados pré e pós-colheita na produção de morangos e sistema Appcc**. In: ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE

PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2006, Pelotas. **Documentos (167)**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, out. 2006. v. 1, p. 101-104.

CALVETE, E. O.; MARIANI, F.; WESP, C. de L.; NIENOW, A. A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.

\_\_\_\_\_; ROCHA, H.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D.; TESSARO, F.; LOSS, J. T. Polinização de morangueiro por *Apis mellifera* em ambiente protegido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CUCURBITÁCEAS, 4., 2007, Porto Seguro. **Anais...** Brasília: Associação Brasileira de Olericultura, 2007. v. 25, p. s9-s9.

CAMARGO FILHO, W. P.; CAMARGO, F. P. Análise da produção de morango dos estados de São Paulo e Minas Gerais e do mercado da CEAGESP. **Informações Econômicas**, v.39, n. 5, p. 42-50, 2009.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; LEONTIEV-ORLOV, O.; BARBIERI, C.; MURTELLE, G.; PAULETTI, G.; ROTA, L.. Comportamento de cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) na região do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 103-105, 2002.

CAO, J.; JIANG, W. Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth. **Scientia horticulturae**, v. 110, n. 2, p. 181-186, 2006.

CAPDEVILLE, G. de; BEER, S. V.; WILSON, C. L.; AIST, J. R. Some cellular correlates of harpin-induced resistance to blue mold of apples. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 103-113, 2008.

CARRÉ-MISSIO, V.; ZAMBOLIN, L.; REZENDE, D. C.; RODRIGUES, F. Á.; COSTA, H. Efeito protetor de silicato de potássio, acibenzolar-s-metil e fungicidas no controle da mancha de Pestalotia (*Pestalotia longisetula*) do morangueiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Salvador. **Anais...** Brasília: sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. v. 31, p. 270-270.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da Época de aplicação e dosagem do Acibenzolar- S-Metil na indução de resistência à murcha-de-verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 67-71, 2004.

CAZORLA, F. M.; ARREBOLA, E.; OLEA, F.; VELASCO, L.; HERMOSO, J. M.; PÉREZ-GARCÍA, A.; TORÉS, J. A.; FARRÉ, J. M.; VICENTE, A. de. Field evaluation of treatments for the control of the bacterial apical necrosis of mango (*Mangifera indica*) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 116, n. 4, p. 279-288, 2006.

CHAERLE, L.; LENK, S.; HAGENBEEK, D.; BUSCHMANN, Claus; STRAETEN, Dominique V. D.. Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 253-262, 2007.

MA, R. L.; COHEHN, M. B.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. Black swallowtail (*Papilio polyxenes*) alleles encode cytochrome P450s that selectively metabolize linear furanocoumarins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 310, n. 2, p. 332-340, 1994.

COOLS, H. J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, n. 5, p. 273-280, 2002.

COSTA, H.; VENTURA, J. A. Manejo integrado de doenças de morango. In: ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2006, Pelotas. **Documentos (167)**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. v. 1, p. 101-104.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; MAZARO, Sérgio Miguel. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 43, n. 7, p. 793-799, 2008.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**. v. 30, n. 3, p. 314-319, 2004.

DIAS, M. S. C. Produção de morangos em regiões não tradicionais. **Informe Agropecuário**, v. 28, n. 236, p. 24-36, 2007.

DIAS, G. B.; RANGEL, T. B. A. Indução de resistência em plantas: o papel do óxido nítrico. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, n. 3, p. 1-8, 2007.

DIXON, R. A; PAIVA, N. L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

DONG, H.; DELANEY, T. P.; BAUER, D. W.; BEER, S. V. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. **The Plant Journal**, v. 20, n. 2, p. 207-215, 1999.

DONG, H.; PENG, J.; BAO, Z.; MENG, X.; BONASERA, J. M.; CHEN, G.; BEER, S. V.; DONG, H. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated *Arabidopsis* growth and insect defense. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3628-3638, 2004.

DURIGAN, M. F. B., MATTIUZ, B.; DURIGAN, J. F. Injúrias mecânicas na qualidade pós-colheita de lima ácida 'Tahiti' armazenada sob condição ambiente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 369-372, 2005.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R.; GRIBALDO, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v. 4, n. 7, p. 1-12, 2009.

FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 29-66, 2001.

FAO - **Agricultural Production/strawberry**. Disponível em : < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em: dezembro de 2008.

FISCHER, I. H.; TOFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de packinhouse. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 304-310, 2007.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M. G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; METRAUX, J.; KESSMANN, H.; RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, v. 10, n. 1, p. 61-70, 1996.

GLAZE BROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p.205-227, 2005.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 233-242, 2008.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. **The Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.

GROPPO, G. A.; TESSARIOLI NETO, J.; BLANCO, M. C. S. G. **A cultura do morangueiro**. Campinas: CATI, 1977. 27p. (CATI .Boletim Técnico, 201).

GUZZO, S. D.; CASTRO, R. M.; KYDA, K.; MARTINS, E. M. F. Ação protetora do Acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

HACISALIHOGU, G.; JI, P.; LONGO, L. M.; OLSON, S.; MOMOL, T. M. Bacterial wilt induced changes in nutrient distribution and biomass and the effect of acibenzolar-S-methyl on bacterial wilt in tomato. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 978-982, 2007.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347-369, 1989.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have learned after 60 years?. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 285-306, 1999.

HENRIQUES, A. T.; BASSANI, V. L.; RASEIRA, M do C.; ZUANAZZI, J. A. S. Antocianos e capacidade antioxidante de frutas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2., 2004; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 1., 2004, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima temperado, 2004. p. 271-280.

HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 137-146, 2001.

\_\_\_\_\_ ; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSÉNMAIR, K. E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v. 88, n. 4, p. 645-654, 2000.

HUTCHEON, C.; ROCHER, J. de; QUI, D. **Harpin activaty multiple plant defense response pathways: Messenger<sup>®</sup>** - Always read and follow label instructions before buying or using this product. EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 7, p. 589-598, 2008.

JIANG, Y.; JOYCE, D. C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruits. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 171-174, 2003.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299-328, 2002.

KOMBRINK, E.; SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2001.

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

KÚC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 7-12, 2001.

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

LAMONDIA, J. A. Efficacy of fungicides and a systemic acquired resistance activator (acibenzolar-S-methyl) against tobacco blue mould. **Crop Protection**, v. 28, n. 1, p. 72-76, 2009.

LAXALT, A. M.; MUNNIK, Teun. Phospholipid signaling in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 332-338, 2002.

LAWRENCE, C. B.; SINGH, N. P.; QIU, J.; GARDNER, R. G.; TUZUN, S. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 211-220, 2000.

LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, v. 10, n. 1, p. 71-82, 1996.

LESTER, S. P.; BUBENHEIM, D.; ROCHER, J. de. **Messenger treatment increases net photosynthetic rates in multiple plant species: Messenger<sup>®</sup>** - Always read and follow label instructions before buying or using this product. EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002.

LIN, T.; ISHIZAKA, M.; ISHII, H. Acibenzolar-S-methyl-Induced Systemic Resistance against Anthracnose and Powdery Mildew Diseases on Cucumber Plants without Accumulation of Phytoalexins. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 1, p. 40-50, 2009.

MACLEAN, D. D.; MURR, D. P.; DeEll, J. R.; MACKAY, A. B.; KUPFERMAN, E. M. Inhibition of PAL, CHS, and ERS1 in 'Red d'Anjou' Pear (*Pyrus communis* L.) by 1-MCP. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 46-55, 2007.

MADAIL, J. C. M.; ANTUNES, L. E.; BELARMINO, L. C.; SILVA, B. A. da; GARDIN, J. A. **Avaliação econômica dos sistemas de produção do morango: convencional, integrado e orgânico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007, 4p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado técnico 181).

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 201-209, 2007.

MALOLEPSZA, U. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and *o*-hydroxyethylrutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. **Crop Protection**, v. 25, p. 956-962, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **BION<sup>®</sup> 500 WG** – registro nº 05801. Brasil: MAPA, 2008. 10 p.



MARCHESE, J. A. **Conteúdo de artemisinina e produção de biomassa em plantas de Artemisinina annua L. pulverizadas com os ativadores da defesa química Acibenzolar-S-metil e proteína harpina.** 2006. 24p. Relatório CNPq (Doutorado SWE) - University of Mississippi, Mississippi, 2006.

MARTIN, G.; BOGDANOVA, A. J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 23-61, 2003.

MATTIUZ, B.; DURIGAN, J. F.. Efeito de injúrias mecânicas na firmeza e coloração de goiabas das cultivares Paluma e Pedro Sato. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 277-281, 2001.

MATTOS, M. L. T. Segurança alimentar: o caso do morango. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2., 2004; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 1., 2004, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima temperado, 2004. p. 121-164.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, v. 82, p. 535-540, 1998.

MAXSON-STEIN, K.; HE, S.; HAMMERSCHMIDT, R.; JONES, A. L. Effect of treating apples trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related proteins genes. **Plant Disease**, v. 86, n. 7, p. 785-790, 2002.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores.** 2007. 105p. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

\_\_\_\_\_; DESCHAMPS, C.; MIO, L. L. M. de; BIASI, L. A.; GOUVEA, A. de; SAUTTER, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

\_\_\_\_\_; GOUVEA, A. de; MIO, L. L. M. de; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A.; CITADIN, I. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de-dendrophoma em morangueiro. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1630-1633, 2006.

MÉTRAUX, J. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.

MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 708, 1999.

NOZELLA, E. F. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 736-740, 2004.

OH, M.; TRICK, H. N.; RAJASHEKAR, C. B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 180-191, 2009.

OLIVEIRA, R. P. de; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, v. 108, n. 655, p. 35-38, 2005.

\_\_\_\_\_; SCIVITTARO, W. B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 520-522, 2006.

\_\_\_\_\_; SCIVITTARO, W. B.; FERREIRA, L. V. **Vernalização de mudas de morangueiro em câmara fria**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 2007. 4p. (Comunicado técnico 156).

ORSOMANDO, G.; LORENZI, M.; FERRARI, E.; CHIARA, C. de; SPISNI, A.; RUGGIERI, S. PcF protein from *Phytophthora cactorum* and its recombinant homologue elicit phenylalanine ammonia lyase activation in tomato. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 7, p. 1470-1476, 2003.

OTTO, R. F.; MORAKAMI, R. K.; REGHIN, M. Y.; CAIRES, E. F. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 217-221, 2009.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2006, Pelotas. **Documentos (167)**... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. v. 1, p. 101-104.

PENTEADO, M. V. C.; FLORES, C. I. B. Folhas da mandioca como fonte de nutrientes. In: CEREDA, M.P. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas: Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. Volume 4. São Paulo: Fundação Cargil, 2000. Disponível em: <[www/raizes-ong.org.br/portugues/indexpor.htm](http://www.raizes-ong.org.br/portugues/indexpor.htm)>. Acesso em: 12 out. 2009.

PERKOVSKAYA, G. Y.; KRAVCHUK, Z. N.; GRODZINSKY, D. M.; DMITRIEV, A. P. Induction of Reactive Oxygen Species and Phytoalexins in Onion (*Allium cepa*) Cell Culture by Biotic Elicitors Derived from the Fungus *Botrytis cinerea*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51, n.5, p. 609-614, 2004. Translated from **Fiziologiya Rastenii**, v. 51, n. 5, p. 680–685, 2004.

PEREIRA, F. de M.; FREITAS, B. M.; VIEIRA NETO, J. M.; LOPES, M. T. do R.; BARBOSA, A. de L.; CAMARGO, R. C. R. de; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, R. S. Efeito tóxico de alimentos alternativos para abelhas *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 533-538, 2007.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; MARTIN DE VOS, S.; VOS, M. de; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOON, L. C.. **Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada**. Volume 13. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 19p.

QUI, D.; CLAYTON, K.. **Messenger enhances plant biomass accumulation: Messenger<sup>®</sup>** - Always read and follow label instructions before buying or using this product. EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002a.

\_\_\_\_\_. **Post-harvest benefits of Messenger treatment: Messenger<sup>®</sup>** - Always read and follow label instructions before buying or using this product. EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002b.

REINBOTHE, S.; MOLLENHAUER, B.; REINBOTHE, C. JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. **Plant Cell**, v. 6, n. 9, p. 1197-1209, 1994.

ROCHER, J. de; BAUER, D.; QUI, D. **Messenger boosts plant growth and development: Messenger<sup>®</sup>** - Always read and follow label instructions before buying or using this product. EDEN BIOSCIENCE CORPORATION, 2002.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. indução de resistência a *Fuzarium oxysporum* f. SP. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SALES JUNIOR, R.; PONTES FILHO, F. S. T.; NUNES, G. H. de S.; TORRES, G. R. de C. Eficiência de Acilbenzolar-S-methyl e oxiclureto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da “Mancha-aquosa” no meloeiro. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 7, n. 1, p. 66-70, 2007.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; RESENDE, M. L. V.; POZZA, E. A.; MIRANDA, J. C.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; MANERBA, F. C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 59-63, 2007.

SAUTTER, C. K.; STORCK, L.; RIZZATTI, M. R.; MALLMANN, Carlos Augusto; BRACKMANN, A. Síntese de *trans*-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós colheita. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1097-1103, 2008.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ - SESA. Relatório do programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos no estado do Paraná. Curitiba: SESA, 2009. 31 p.

SHIGEMATSU, S.; ISHIDA, S.; HARA, M.; TAKAHASHI, N.; YOSHIMATSU, H.; SAKATA, T.; KORTHUIS, R. J. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 7, p. 810-817, 2003.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SOARES, T. de J.; VOLPINI, R. A.; FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; SILVA, Cleonice G. A.; COIMBRA, Terezila M. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. **Life Sciences**, v. 81, n. 8, p. 647-656, 2007.

SOLEAS, G. J.; DAM, J.; CAREY, M.; GOLDBERG, D. M. Toward the fingerprinting of wines: cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 3871-3880, 1997.

SORIANO-RICHARDS, E.; URIBE-SALAS, D.; IBARRA-BARRERA, G. Phaseollidin stored in vacuoles and phytoalexin response in bean. **Plant Pathology**, v. 47, n. 4, p. 480-485, 1998.

SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on Apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acilbenzolar-S-metyl, baking soda, or ethanol application. **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, n. 2, p. 141-151, 2004.

SPECHT, S.; BLUME, R. Competitividade e segmento de mercado à cadeia do morango: algumas evidências sobre o panorama mundial e brasileiro. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Palestras...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009, p. 1-17.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2000.

STASWICK, P. E.; LEHMAN, C. C. Jasmonic Acid-Signaled Response in Plants, Induced Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. **APS Press**, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-70, 1997.

TANAKA, M. A. S. Controle de doenças causadas por fungos e bactéria em morangueiro. In: ZAMBOLIM, L. et al. **Controle de Doenças de Plantas**. Viçosa: UFV, 2002. p. 69-140.

\_\_\_\_\_; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Volume 2. 4 Ed. São Paulo: Ceres, 2005. p. 556-571.

\_\_\_\_\_; PASSOS, F. A.. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 5, p. 484-488, 2002.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A.; BETTY, J. A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum acutatum* a benomyl na cultura do morango no Estado de São Paulo. **Science Agricola**, v. 54, n. 3, p.139-146, 1997.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C., Suppression of grey mould on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. **Pest Management Science**, v. 56, p. 989-992, 2000.

THIMÓTEO, A.; RESENDE, J. T. V. de; GONÇALVES, W. M.; RESENDE, L. V.; NASCIMENTO, I. R. do; FARIA, M. V. **Expectativa de retorno e risco da produção de morangos no município de Guarapuava – PR**. Disponível em: [http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46\\_0093.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0093.pdf). Acesso em: março de 2010.

TUBAJIKA, K. M.; CIVEROLO, E. L.; PUTERKA, G. J.; HASHIM, J. M.; LUVISI, D. A. The effects of kaolin, harpin, and imidacloprid on development of Pierce's disease in grape. **Crop Protection**, v. 26, n. 2, p. 92-99, 2007.

UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. Biopesticide Regulatory Action Document. **Harpinaß protein - ProAct™**. (PC Code 006506). Washington: Biopesticides and Pollution Prevention Division, 2005. 23 p.

\_\_\_\_\_. **Biopesticide regulatory action document: Harpin Protein - Messenger**. Washington: Biopesticides and Pollution Prevention Division, 2002. 32p.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-83, 1998.

\_\_\_\_\_; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, 7.1–7.28, 2006.

VARDAPETYAN, H. R.; KIRAKOSYAN, A. B.; OGANESYAN, A. A.; PENESYAN, A. R.; ALFERMANN, W. A. Effect of Various Elicitors on Lignan Biosynthesis in Callus Cultures of *Linum austriacum*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 3, p. 297–300, 2003.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006. 285p. p. 81.

VERONA, L. A. F.; NESI, C. N.; GROSSI, R.; STENGER, E. A. F. Produtividade e incidência de doenças em cultivares de morangueiro no sistema orgânico de produção. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1021-1024, 2007.

WALTERS, D. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v. 30, p. 1-7, 2009.

WANG, S. Y.; LIN, H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and development stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce Systemic Acquired Resistance. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WARGOVICH, M. J. Red fruits as functional foods for the prevention of cancer. In: ENCONTRO NACIONAL DO MORANGO E II ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2006, Pelotas. **Documentos (167)...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. v. 1, p. 129-130.

WEI, Z.; LABY, R. J.; ZUMOFF, C. H.; BAUER, D. W.; HE, S. Y.; COLLMER, A.; BEER, S. V. Harpin Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia Amylovora*. **Science**, v. 257, n. 5066, p. 85-88, 1992.

WEIDHASE, R. A.; KRAMELL, H.; LEHMANN, J.; LIEBISCH, H.; LERBS, W.; PARTHIER, B. Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. **Plant Science**, v. 51, n. 2-3, p. 177-186, 1987.

WITTMAN, L. Cultivo de morango orgânico no município de Jandaia do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n.2, p. 3993-3994, 2009.

WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, Jonathan. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 300-307, 2002.

YESIL-CELIK TAS, O.; NARTOPB, P.; GURELB, A.; BEDIRB, E.; VARDAR-SUKANB, F. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 11, p. 1536-1542, 2007.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; LI, J.; JI, R.; SHEN, G.; WANG, S.; ZHOU, X.; ZHENG, X. The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 31-38, 2004.

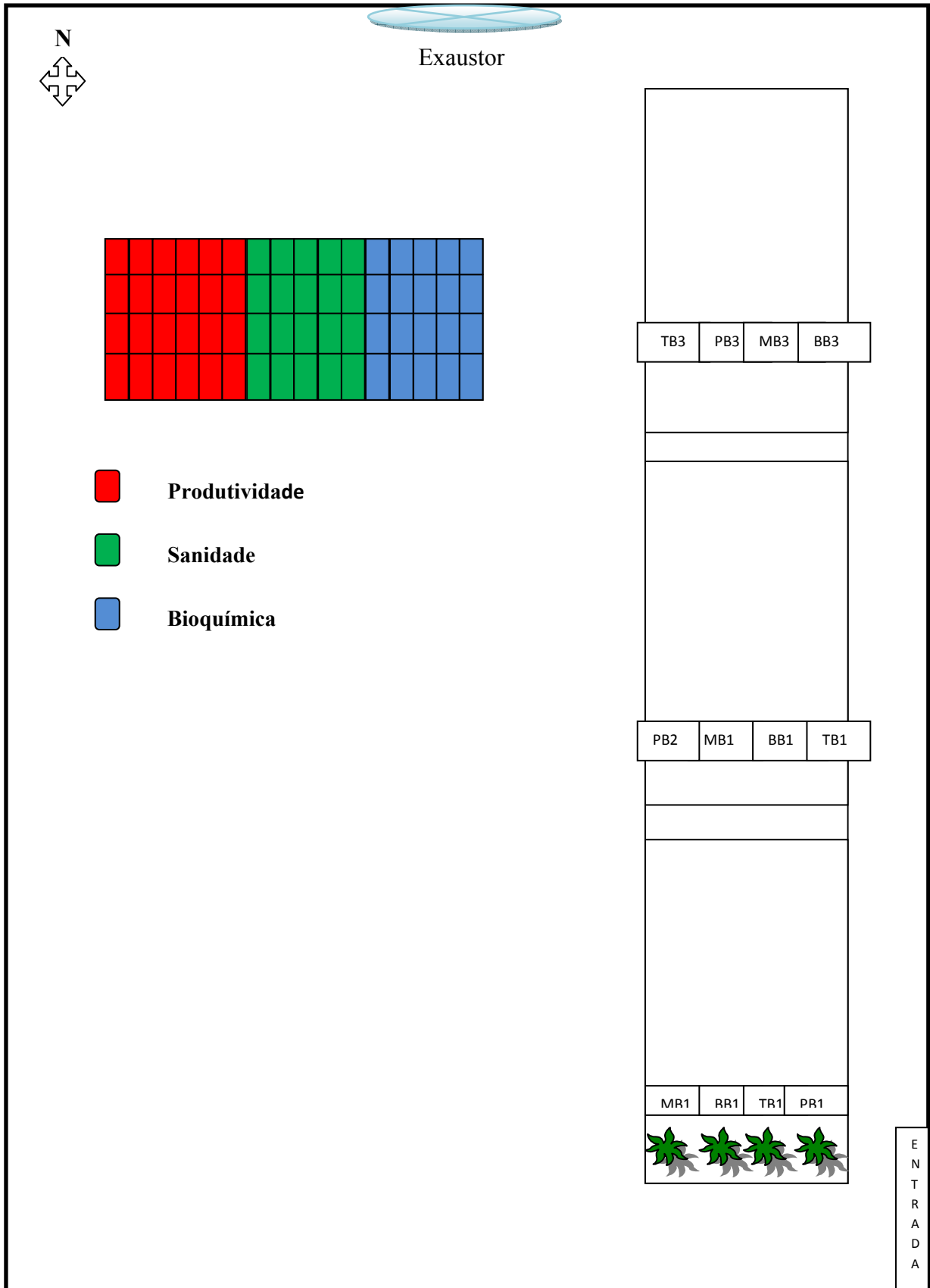


**ÍNDICE DE APÊNDICES E ANEXOS**

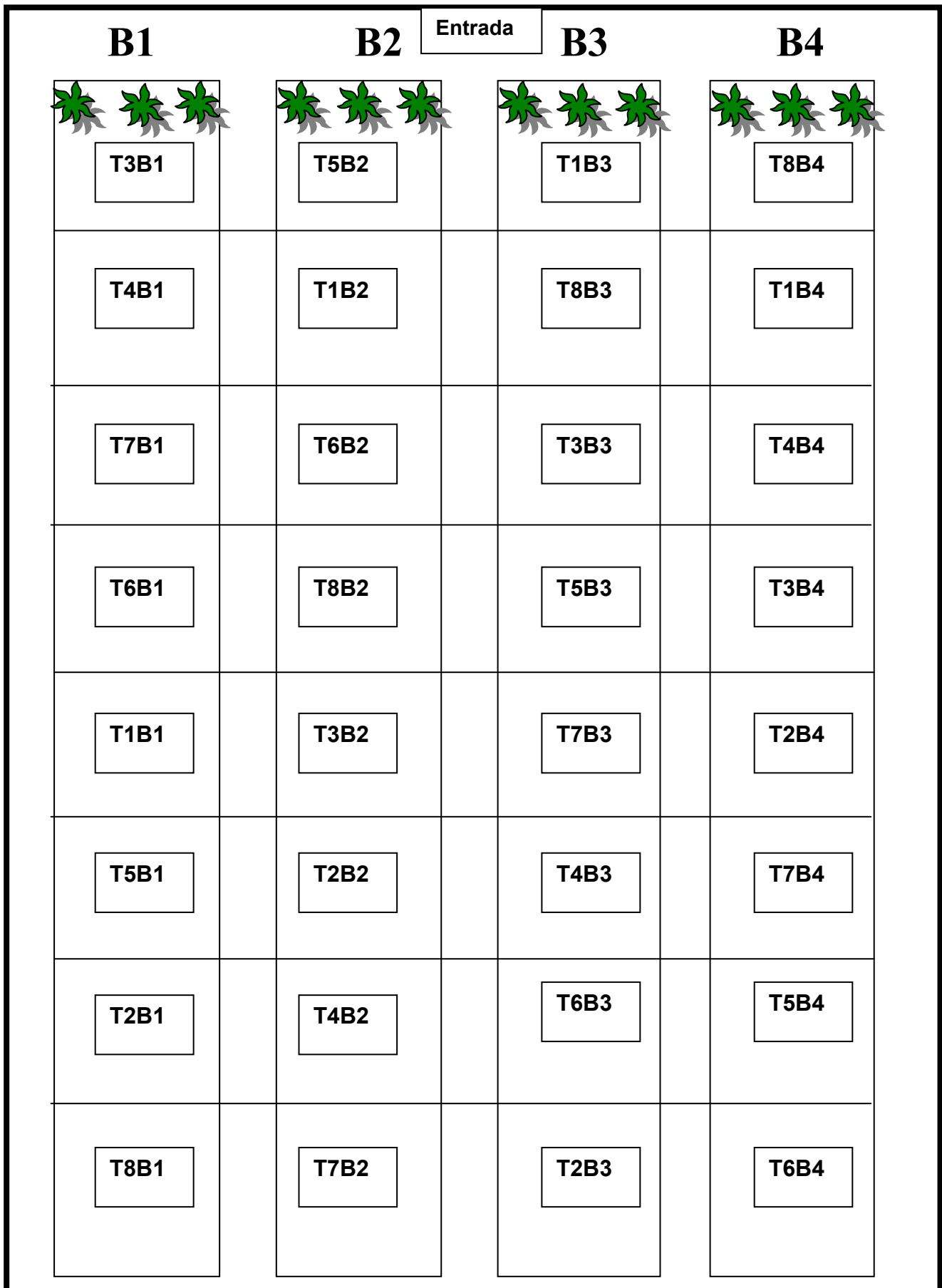
APÊNDICE A – Croqui do experimento 1 em pré-colheita.....	98
APÊNDICE B - Croqui do experimento 2 em pré colheita.....	99
APÊNDICE C – Croqui do experimento 1 em pós-colheita.....	100
APÊNDICE D - Croqui do experimento 2 em pós-colheita.....	101
ANEXO A – Escala diagramática para mancha-de-dendrofoma em morangueiro (Mazaro et al., 2005).....	102

# APÊNDICES

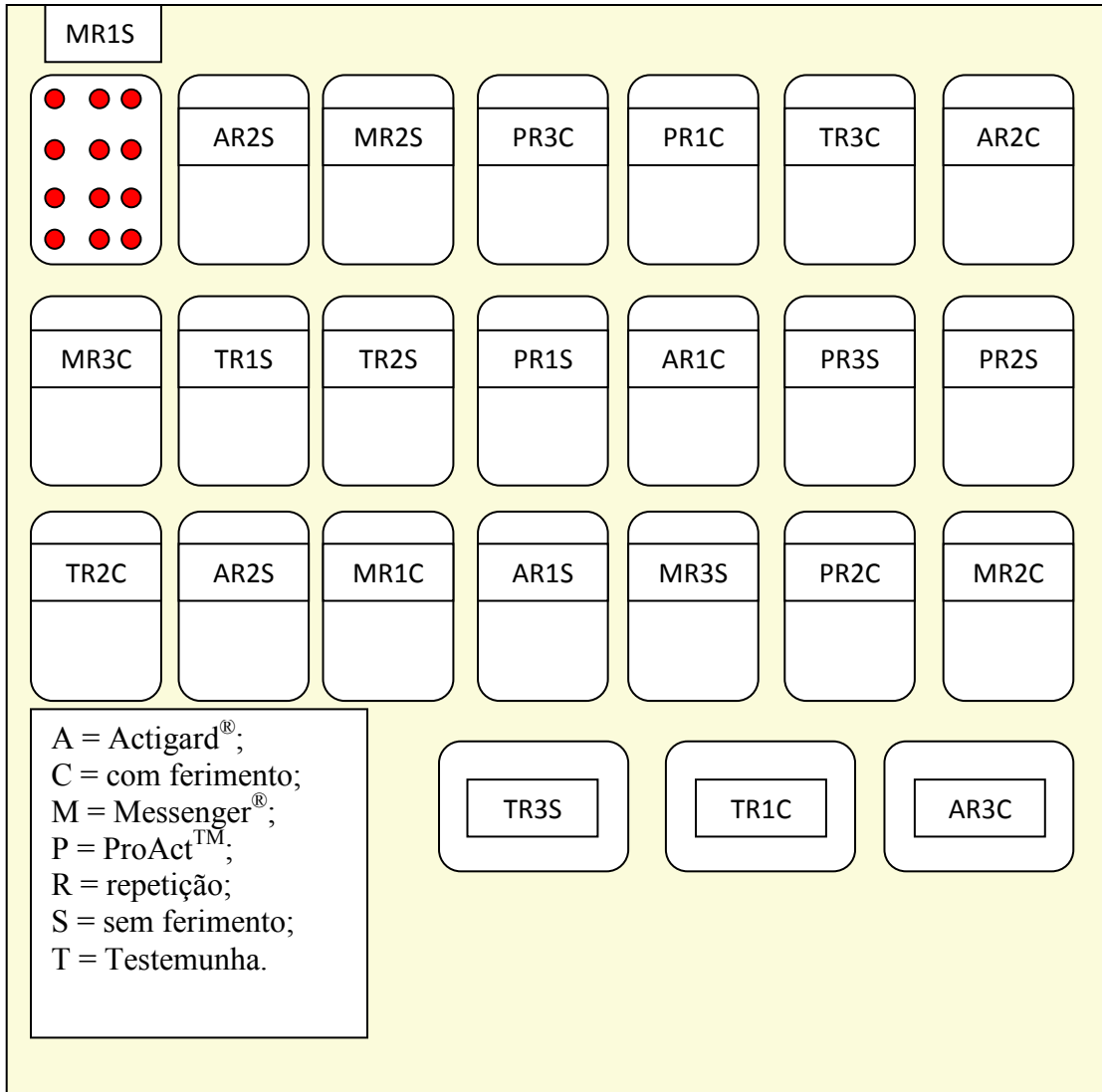
APÊNDICE A – Croqui do experimento 1 em pré-colheita.



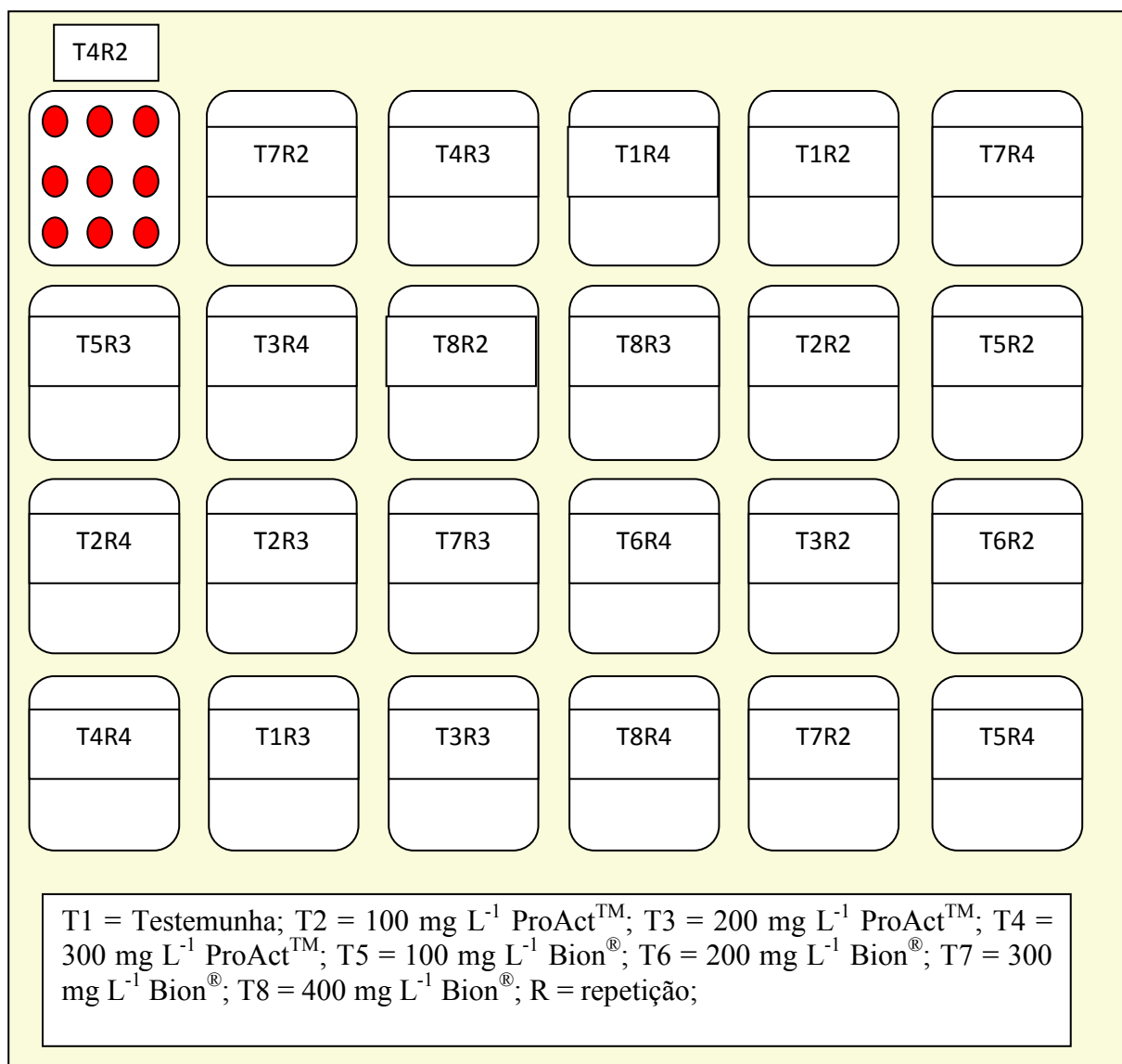
APÊNDICE B - Croqui do experimento 2 em pré colheita.



APÊNDICE C – Croqui do experimento 1 em pós-colheita.

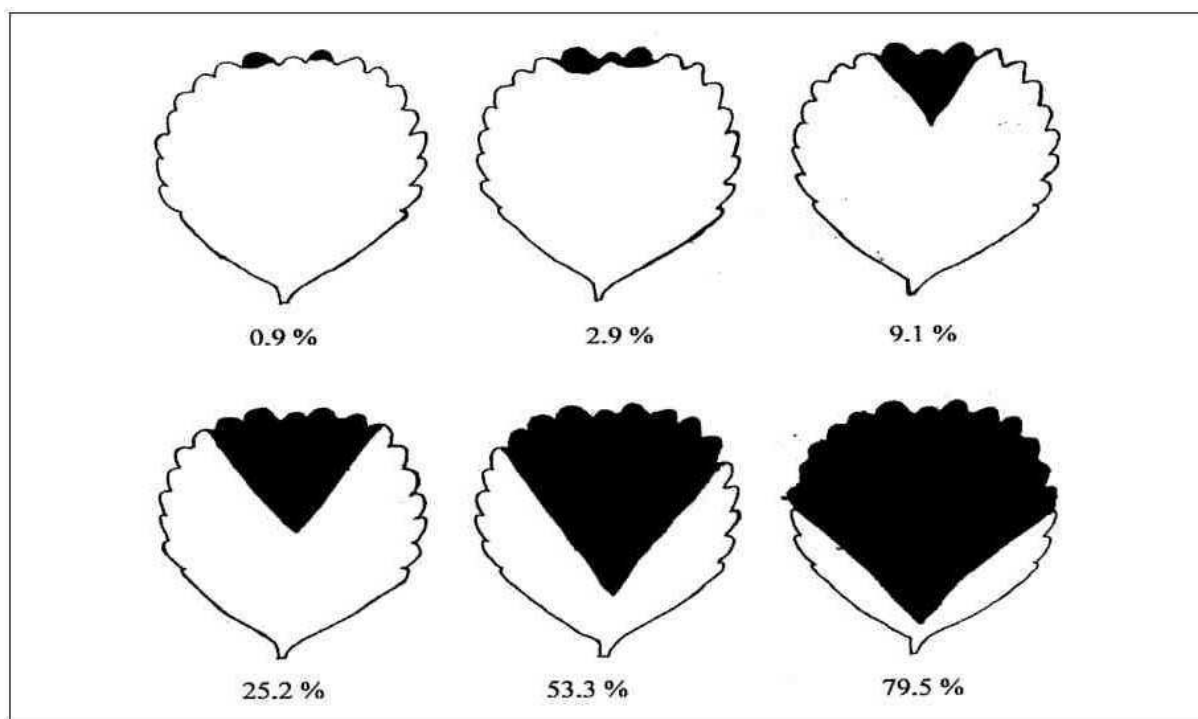


## APÊNDICE D - Croqui do experimento 2 em pós-colheita.



## ANEXOS

ANEXO A – Escala diagramática para mancha-de-dendrofoma em morangueiro.



Fonte: Mazaró et al., 2005.