



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Bruna Rodrigues

**PRÓPOLIS, POLISSACARÍDEO DO SHITAKE (*Lentinula edodes*) E
ACIBENZOLAR -S-METIL PARA O CONTROLE DA MANCHA ANGULAR
(*Xanthomonas fragariae*) NO MORANGUEIRO**

Florianópolis, SC

2019

Bruna Rodrigues

**PRÓPOLIS, POLISSACARÍDEO DO SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E
ACIBENZOLAR -S-METIL PARA O CONTROLE DA MANCHA ANGULAR
(*Xanthomonas fragariae*) NO MORANGUEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de
Mestre. Orientador: Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis, SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues, Bruna
PRÓPOLIS, POLISSACARÍDEO DO SHIITAKE (*Lentinula edodes*)
E ACIBENZOLAR -S-METIL PARA O CONTROLE DA MANCHA ANGULAR
(*Xanthomonas fragariae*) NO MORANGUEIRO / Bruna Rodrigues ;
orientador, Robson M. Di Piero, 2019.
69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. I. Di Piero, Robson M.
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Bruna Rodrigues

**PRÓPOLIS, POLISSACARÍDEO DO SHITAKE (*Lentinula edodes*) E
ACIBENZOLAR -S-METIL PARA O CONTROLE DA MANCHA ANGULAR
(*Xanthomonas fragariae*) NO MORANGUEIRO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Luiz Augusto Martins Peruch, Dr.
EPAGRI

Prof. Marciel João Stadnik, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Juliana Bernardi Ogliari, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências.

Prof. Dr. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero.
Orientador

Florianópolis, 10 de setembro de 2019.

Dedico esse trabalho aos meus pais Inês e Luiz, aos meus irmãos Cheysa, Taynara e Thálysson, a toda minha família pelo suporte, aos amigos e ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do mestrado.

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

Ao Professor Dr. Robson Marcelo Di Piero pelos ensinamentos, paciência, preocupação, dedicação e pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio José Rossi (MIP-UFSC), (Cogumelos de shiitake), a empresa Prodapys (fontes de própolis) e ao Oscar Artaza (fonte de própolis) por fornecerem os materiais utilizados neste trabalho.

Aos doutores Luiz Augusto Martins Peruch, Juliana Bernardi Ogliari, Marciel João Stadnik, Mateus Brusco de Freitas por aceitarem participar da banca examinadora;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia: Ariana, Camile, Lida, Ludiana, Paula F., Eduardo, Denise, Mateus, Argus, Luciana, Charles, Felipe, Débora, Aline, Marlon, Zamira, Tarsis, Juliana, Juliane, Carolina e Caroline por todos os ensinamentos, dedicação e risadas que compartilhamos durante esses anos.

Ao meu amigo Paulo pelo carinho, confiança e força nos momentos que eu mais precisei.

À minha família pelo alicerce, apoio, amor e por sempre me incentivarem nas realizações dos meus sonhos.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Extratos de própolis e do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) são permitidos na agricultura orgânica, porém, faltam pesquisas com esses materiais relacionadas ao controle de doenças de plantas. Esses compostos e o indutor de resistência comercial Acibenzolar-S-metil (ASM) foram avaliados contra a mancha angular do morangueiro causada por *Xanthomonas fragariae*, uma bacteriose que provoca perdas de aproximadamente 30% na produção de morangos. *In vitro*, avaliou-se o efeito dos compostos sobre a formação de colônias e de biofilme bacteriano. Em casa de vegetação, plantas de morango com três folhas verdadeiras foram pulverizadas com o polissacarídeo do shiitake (PSHII) (3 mg/mL), extrato de própolis verde de Wenceslau-Braz – PR (PVERD1) (5 mg/mL) e ASM (25 ppm) e aos 7,14 e 21 dias foi avaliada a severidade da doença. Amostras foliares foram coletadas para se determinar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, assim como a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), superóxido dismutase (SOD) e catalase. PSHII e o ASM reduziram a severidade da doença em aproximadamente 30% em plantas de morango da cultivar San Andreas. Além disso, observou-se um aumento na atividade de superóxido dismutase 3 dias após a aplicação desses compostos. Na cv. Albion, ASM promoveu um maior nível de redução na severidade em torno de 60 e 80% quando aplicado 3 e 6 dias antes da inoculação respectivamente. Entretanto, no caso do extrato de própolis (PVERD1), uma proteção significativa das plantas foi observada apenas para a cultivar Albion. Na cultivar San Andreas, PVERD1 atrasou o desenvolvimento da doença e promoveu o aumento na atividade da FAL 3 dias após a aplicação. *In vitro*, PVERD1 a 1 mg/mL inibiu totalmente a formação de colônias e parcialmente o biofilme bacteriano. Dessa forma, o polissacarídeo extraído de biomassa fúngica de *L. edodes*, o extrato de própolis e o indutor comercial ASM demonstraram algum potencial para o controle da mancha angular do morangueiro. Porém mais estudos devem ser realizados para se avaliar o efeito dos produtos sobre os mecanismos de defesa das plantas.

Palavras-chave: *Xanthomonas fragariae*; Mancha angular; Atividade de enzimas antioxidantes; Própolis; Substrato de cultivo de cogumelo de shiitake; Morangueiro.

ABSTRACT

Extracts of propolis and shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) are permitted in organic agriculture, however, research is lacking with these materials related to the control of plant diseases. These compounds and the commercial resistance inducer *Acibenzolar-S-methyl* (ASM) were evaluated against the disease caused by *Xanthomonas fragariae*, a bacteriosis that promotes losses of approximately 30% in the production of strawberries. *In vitro*, the effect of the compounds on the formation of colonies and bacterial biofilms was evaluated. In a greenhouse, strawberry plants with three true leaves were sprayed with shiitake polysaccharide (3 mg / mL), green propolis extract from Wenceslau-Braz -PR (PVERD1) (5 mg / mL) and ASM (25 ppm) and 7,14 and 21 days the severity of the disease was evaluated. Foliar samples were collected to determine the content of phenolic compounds and flavonoids, as well as the activity of the enzymes phenylalanine ammonia, superoxide dismutase and catalase. The *L. edodes* polysaccharide and the ASM reduced the severity of the disease by around 30% in strawberry plants of the cultivar San Andreas. In addition, it was observed an increase in the superoxide dismutase activity 3 days after the application of these compounds. In cv. Albion, ASM provided a higher level of reduction in severity, around 60 and 80%, when applied 3 and 6 days before inoculation, respectively. However, a significant protection of plants over time, conferred by propolis (PVERD1), was observed only for the Albion cultivar. In the cultivar San Andreas, PVERD1 delayed the development of the disease and promoted the increase in FAL activity 3 days after application. *In vitro*, PVERD1 at 1 mg/mL completely inhibited the formation of colonies and partially the bacterial biofilm. Thus, the polysaccharide extracted from fungal biomass of *L. edodes*, the propolis extract and the commercial inductor (ASM) demonstrated some potential for the control of angular spot in strawberry plants. However, further studies should be conducted to evaluate the effect of the products on plant defense mechanisms.

Keywords: *Xanthomonas fragariae*; Angular leaf spot; Antioxidant enzymes activity; Propolis; Spent mushroom substrate; shiitake; Strawberry plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras de própolis coletadas em diferentes municípios do Brasil. 33

Figura 2 - Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (PVERD1 1,0 mg/ mL), do polissacarídeo extraído do shiitake (PSHII 1,0 mg/mL) e do Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), sobre a formação de biofilme da bactéria (*Xanthomonas fragariae*), em dois experimentos distintos. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 42

Figura 3 - Atividade de fenilalanina amonia-liase em plantas de morango da cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. 44

Figura 4 - Atividade de superóxido dismutase em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. 45

Figura 5 - Atividade de catalase em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. 46

Figura 6 - Conteúdo de compostos fenólicos em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆);

polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (\blacksquare), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas, diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. 47

Figura 7 - Conteúdo de flavonoides em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (\bullet), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (\blacklozenge); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (\blacksquare), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Amostras de própolis coletadas em diferentes municípios do Brasil e empregadas nesse estudo..... 32
- Tabela 2 - Quantificação de massa fresca, compostos fenólicos e flavonoides a partir de quatro fontes de extrato hidroalcoólico, de própolis verde (PVERD1 e PVERD2), própolis vermelha (PVERM) e própolis marrom (PMARR).. 39
- Tabela 3- Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 15, 22 e 29 dias após a inoculação, em plantas de morango (cultivar Albion) tratadas com água destilada ou álcool 0,01% (controles), calda bordalesa (CAB 1%), suspensão de polissacarídeo do shiitake (PSHII, 3 mg / mL), extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2, a 5mg/mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 3 dias antes da inoculação.40
- Tabela 4 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 15, 22 e 29 dias após a inoculação, em plantas de morango (cultivar Albion) tratadas com água destilada ou álcool 0,01% (controles), calda bordalesa (CAB 1%), suspensão de polissacarídeo do shiitake (PSHII, 3 mg / mL), extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2 -5mg/mL), e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 6 dias antes da inoculação.40
- Tabela 5 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 7, 14 e 21 dias após a inoculação das plantas de morango (cultivar San Andreas) tratadas com água destilada (controle), extrato hidroalcoólico de própolis PVERD1 (5mg/mL), suspensão de polissacarídeo do Shiitake (PSHII, 3 mg / mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 3 dias antes da inoculação. 41
- Tabela 6 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*), 7, 14 e 21 dias após a inoculação das plantas de morango (cultivar San Andreas) tratadas com água destilada (controle), extrato hidroalcoólico de própolis PVERD1 (5mg/mL), suspensão de polissacarídeo do Shiitake (PSHII, 3 mg / mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), 3 dias antes da inoculação. 41

Tabela 7 - Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (PVERD1 1,0 mg/ mL), da suspensão do polissacarídeo do shiitake (PSHII 1,0 mg/mL) e do Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), sobre o número de unidades formadoras de colônia da bactéria (*Xanthomonas fragariae*), em dois experimentos distintos. Avaliação realizada 7 dias após a incubação.⁴³

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASM – Acibenzolar-S-metil

CAT – Catalase

CUIT - Código Único de Identificação Tributária

EDTA - Ácido Etileno diamino Tetra-Acético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FAL - Fenilalanina amônia-liase

FENOL – Compostos fenólicos totais

FLAVO - Flavonoides

HCl - Ácido Clorídrico

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PMARR – Extrato hidroalcoólico de própolis marrom coletado em Muzambinho, Minas Gerais

PVERD1 – Extrato hidroalcoólico de própolis verde coletado em Wenceslau-Braz, Paraná

PVERD2 – Extrato hidroalcoólico de própolis verde coletado em Ibaiti, Paraná

PVERM – Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha coletado em Prado, Bahia

PSHII – Polissacarídeo da biomassa fúngica de *L. edodes* (cogumelo shiitake)

SOD - Superóxido dismutase

YSG – Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. HIPÓTESES	21
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO	22
4.1.1 Características botânicas do morangueiro <i>Fragariae ananassa</i>	22
4.1.2 Produção de morango no Brasil.....	22
4.1.3 Mancha Angular de <i>Xanthomonas fragariae</i>	24
4.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E ACIBENZOLAR-S-METIL	24
4.3 UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS	28
4.4 UTILIZAÇÃO DO COGUMELO SHIITAKE <i>Lentinula edodes</i> NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 CULTIVO DO MORANGUEIRO E OBTENÇÃO DO INÓCULO	31
5.2 PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS.....	32
5.3 PREPARO DOS EXTRATOS DO POLISSACARÍDEO DO SHIITAKE.....	33
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS.....	34
5.5. EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	34
5.6 EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE A SEVERIDADE DA MANCHA ANGULAR.....	35
5.7 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA EM MORANGUEIROS	36
5.7.1 Fenilalanina amônia-liase.....	36
5.7.2 Atividade de surperóxido dismutase e catalase.....	36
5.7.3 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides.....	37
5.7.4 Flavonoides	38
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
7. RESULTADOS.....	38
7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FONTES DE PRÓPOLIS	38
7.2 ENSAIOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS	39

7.3 EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE A FORMAÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO	42
7.4 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE DEFESA.....	43
7.4.1. Fenilalanina amônia-liase - FAL	43
7.4.2. Superóxido dismutase - SOD.....	44
7.4.3. Catalase.....	45
7.4.4. Compostos fenólicos.....	46
7.4.5. Flavonoides	47
8. DISCUSSÃO	48
9. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) vem crescendo nos últimos anos em várias regiões do Brasil tanto para a produção de matéria prima para a indústria de alimentos quanto para o consumo *in natura*. O morangueiro é bastante vulnerável a uma série de patógenos destacando-se fungos e bactérias. Dentre as principais doenças que acometem a cultura do morangueiro pode-se destacar a mancha angular provocada pela bactéria *Xanthomonas fragariae* (KENNEDY E KING, 1962), verificada em áreas de cultivo da América do Norte e do Sul, Europa, África, Austrália e Nova Zelândia (MASS et al., 1995).

Essa doença tornou-se um grande obstáculo na produção de morangos em todo o mundo. Além disso, a mancha angular vem ocorrendo com alta incidência em algumas áreas do Brasil sendo verificada em lavouras de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Espírito Santo (COSTA et al., 2006). É a única doença bacteriana do morangueiro de importância econômica no país. Plantas infectadas sofrem intensa redução da área foliar fotossintética, resultando em retardo de desenvolvimento, queda do vigor das plantas e consequentemente diminuição na produção e na qualidade dos frutos. A bactéria infecta pelos estômatos e uma semana após a infecção as plantas apresentam manchas angulares translúcidas na face abaxial das folhas. Após duas semanas observam-se lesões necróticas de formato irregular havendo exsudação das células bacterianas em alguns casos. Essa doença possui difícil controle e rápida disseminação no campo em condições de elevada umidade relativa e precipitação, e sob temperaturas de 20 e 30 °C (REIS et al., 2011).

A mancha angular (*X. fragariae*) pode causar grande perda na produção de morangos se não controlada. Entretanto no Brasil, o controle é feito basicamente de maneira preventiva através da introdução de mudas saudáveis no pomar retiradas de plantas ou folhas que estão doentes, adubação e irrigação equilibrada, realização de rotação de culturas, seleção de material vegetal menos susceptível à doença e a aplicação de agrotóxicos a base de cobre. Os produtos químicos são predominantemente utilizados na tentativa de controle de doenças em morangueiro devido à falta de materiais resistentes. Essas aplicações por sua vez, apresentam baixa eficácia, aumentam os custos de produção, além do favorecimento da seleção de linhagens patogênicas resistentes aos ingredientes ativos.

Contudo, novos métodos de controle da mancha angular vêm sendo estudados, menos prejudiciais ao ser humano e ao meio ambiente. Diante disso, produtos que tenham capacidade de indução de resistência em plantas ou com efeitos antimicrobianos podem se

tornar ferramentas alternativas eficientes no controle de doenças em plantas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; GAMBACORTA et al., 2005; PAULUS et al., 1990; RESENDE et al., 2007). Além disso, produtos homeopáticos, extratos de plantas e preparações são permitidos na agricultura orgânica, porém ainda não é conhecida sua eficiência no controle de doenças, principalmente as do morangueiro.

Um material que poderia ser mais pesquisado é a própolis, produto liberado no sistema de produção orgânico para o controle de doenças em plantas e que apresenta efeito antimicrobiano. A própolis é uma substância resinosa, coletada por abelhas a partir de diferentes exsudatos vegetais que a transportam até a colmeia, onde modificam sua composição por secreções próprias e salivares. No Brasil há uma grande variedade de própolis tais como: a própolis verde ou marrom esverdeada, amarela, amarela escura, castanho escuro, castanho claro e mais recentemente a vermelha (BANKOVA 2009; PARK et al., 2000; TRUSHEVA et al., 2006). A própolis tem sido muito utilizada devido às suas propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e outras propriedades terapêuticas. (BANSKOTA et al., 2001; KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI et al., 2001; SFORCIN et al., 2000). Estudando própolis de diferentes origens geográficas, GHISALBERT et al (1977) observaram que a composição química varia qualitativamente e quantitativamente dependendo das características fitogeográficas da região de coleta. Segundo MARCUCCI et al. (1995), características como cor, sabor, odor, consistência, composição química e atividade biológica, dependem diretamente da origem botânica dos exsudatos e das estações do ano. Em amostras de própolis já foram identificados pelo menos 200 componentes diferentes dentre esses estão os ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides, terpenos, β -esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno. Entre as substâncias isoladas, polifenóis especialmente os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), são os principais responsáveis pelas atividades antibacterianas, antioxidante, anti-inflamatório (BANKOVA et al., 1995; GREENAWAY et al., 1991; MARCUCCI et al., 1996, 2001).

A atividade antimicrobiana da própolis já foi evidenciada contra algumas espécies de bactérias fitopatogênicas. BIANCHINI et al. (1998) constataram ação de extratos aquosos de própolis contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia chrysanthemi* e *Xanthomonas axonopodis*. Contra fungos fitopatogênicos. MARINI et al. (2012) observaram que os extratos alcoólicos de própolis inibiram a germinação de esporos de *Phakopsora euvitis* e *Pseudocercospora vitis* e também o crescimento micelial e a esporulação de *Elsinoe ampelina*. Também foi observada a inibição dos fungos causadores de

podridões em pós-colheita de frutos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* (MENESES et al., 2009) e *Penicillium italicum* (YANG et al., 2011). Pereira et al. (2008) observaram redução na severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro, e na incidência e severidade da ferrugem em cafeeiros no campo com a aplicação foliar de extrato etanólico de própolis.

Além da antibiose, o controle de doenças de plantas a partir do uso de compostos de baixo impacto ambiental poderia se dar através da indução de resistência (PASCHOLATI, 2003). A resistência pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias (eliciadores), impedindo ou atrasando a entrada do fitopatógeno em seus tecidos (RESENDE et al., 2007). Dentre os mecanismos de defesa vegetal acionados podem ser citados: barreiras estruturais pós-formadas, acúmulo de lignina nos tecidos vegetais, aumento na síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), como a β -1,3-glucanase, peroxidases, polifenoloxidase, quitinases. Estudos avaliando o efeito indutor de resistência da própolis foram realizados por Piva et al. (2015) em cultura de pepino onde extratos etanólicos promoveram o acúmulo de fitoalexinas, um importante mecanismo de defesa das plantas.

Assim como os extratos de própolis, macrofungos exibindo corpo de frutificação (cogumelos) apresentam elicitores de defesa vegetal e produzem compostos antimicrobianos. O cogumelo "shiitake" *Lentinula edodes* é um fungo basidiomiceto que pode ser cultivado em troncos de árvores ou em substratos. É o segundo cogumelo mais produzido e consumido no mundo ficando atrás apenas do champignon (DI PIERO et al., 2003). Devido à demanda do mercado consumidor por cogumelos padronizados há uma grande produção de biomassa fúngica. No entanto, poucos destinos são relatados para os resíduos e excedentes de produção. Estudando o efeito dos polissacarídeos extraídos de biomassa fúngica de *L. edodes*, AGUIAR et al. (2018) constataram redução em até 57% na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. Esses polissacarídeos podem apresentar diferentes funções biológicas na planta atuando na proteção contra fatores de estresse ambiental e na interação com outros organismos. Além disso, são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, imunoestimulantes, antitumorais e antimicrobianas (OSIŃSKA-JAROSZUK et al., 2015).

No Brasil existe atualmente apenas um ingrediente ativo comercializado que ativa os mecanismos naturais de defesa e aumenta a resistência das plantas às doenças, o Acibenzolar-S-metil (ASM), um análogo do ácido salicílico. O efeito elicitor do ASM foi demonstrado em culturas de tomate (HACISALIHOGU et al., 2007), cacau (CAVALCANTI et al., 2005), melão (SALES et al., 2007), pimenta (BAYSAL et al., 2005), manga (CAZORLA et al., 2006) e pêssego (DANNER et al., 2008). Em morango, o ASM apresentou eficiência na

redução da mancha-de-micosferela, flor-preta e mancha-de-dendrofoma (MAZARO, 2007). Os produtos comerciais, Bion ® e Actigard®, possuem registro para o controle de algumas doenças. Dentre as bacterioses podem ser destacadas: a mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), Canela-preta (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*)

Apesar do exposto, são escassos os trabalhos realizados com extratos de própolis e com resíduos de biomassas fúngicas para o controle de doenças em plantas. São necessários mais estudos para dar confiabilidade aos agricultores que estão inseridos no sistema de produção orgânico, além de contribuir com resultados de interesse científico. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP), do polissacarídeo extraído de biomassa fúngica de *L. edodes* (PSHII) e do acibenzolar-s-metil (ASM) no controle da mancha angular de *Xanthomonas fragariae* em morangueiro, bem como determinar os modos de ação envolvidos. Com isso, espera-se disponibilizar aos agricultores uma alternativa de controle acessível para a produção de morangos que não deixe resíduos tóxicos nos frutos e de baixo impacto ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis, do polissacarídeo extraído de biomassa fúngica de *L. edodes* e do indutor de resistência comercial (Acibenzolar-S-metil), na proteção de morangueiro contra a mancha angular de *Xanthomonas fragariae* e estudar os mecanismos de ação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as fontes de própolis através da determinação do teor de compostos fenólicos totais e flavonoides presentes nos extratos hidroalcoólicos;
2. Verificar o efeito dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP), do polissacarídeo extraído de biomassa fúngica de shiitake (PSHII) e do Acibenzola-S-metil (ASM), sobre o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas fragariae* e a formação do biofilme bacteriano;
3. Avaliar o efeito de diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis, polissacarídeo extraído de biomassa fúngica de shiitake (PSHII) e do Acibenzolar-S-metil (ASM), sobre a severidade da mancha angular do morangueiro;
4. Estudar o modo de ação dos produtos determinando-se a atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) bem como o teor de compostos fenólicos totais (FENÓIS) e flavonoides (FLAVO) em morangueiros tratados com diferentes EHP, PSHII ou ASM, e inoculados com *X. fragariae*.
5. Contribuir para a geração de tecnologias mais seguras aos agricultores e para a produção de alimentos de qualidade com baixo impacto ambiental.

3. HIPÓTESES

Os polissacarídeos extraídos de biomassa fúngica de *L. edodes*, os extratos hidroalcoólicos de própolis e o acibenzolar-s-metil reduzem a severidade da mancha angular em morangueiro.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO

4.1.1 Características botânicas do morangueiro *Fragariae ananassa*

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta perene, rasteira, herbácea, pertencente à família Rosácea e ao gênero *Fragaria* (GOMES et al., 2007). *Fragaria x ananassa* Duch. é resultante da hibridação natural entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana* sendo o híbrido mais cultivado atualmente (SILVA et al., 2007). O sistema radicular é composto por raízes adventícias e fasciculadas onde grande parte das raízes encontra-se nos primeiros 20 cm de profundidade. Os caules possuem formato cilíndrico e retorcido do qual emergem em roseta as folhas trifoliadas. A taxa de emergência das folhas depende fundamentalmente da temperatura sendo maior na primavera e no verão (PALHA et al., 2005).

A propagação do morangueiro é realizada por estolões, gerados da planta-mãe em condições de fotoperíodo longo e de temperatura elevada (COCCO et al., 2010), os quais crescem sobre a superfície do solo emitindo novas raízes e dando origem a novas plantas. As inflorescências possuem número variável de flores, sendo formadas a partir das gemas existentes nas axilas das folhas. As flores são geralmente hermafroditas, pseudo-hermafroditas ou imperfeitas (unissexuais) com pétalas brancas ou avermelhadas (CALVETE et al., 2012). Após a fecundação do receptáculo floral origina-se a porção suculenta do morango, ou seja, o pseudofruto (receptáculo floral desenvolvido). Os frutos verdadeiros são pequenos aquênios que ficam sobre o receptáculo proeminente (BARROSO et al., 1999; HOFFMANN et al., 2006; SILVA et al., 2007).

4.1.2 Produção de morango no Brasil

O morango é consumido tanto na sua forma *in natura* quanto na forma de processamentos industriais (REICHERT; MADAIL, 2003). É produzido tanto em regiões frias quanto em regiões de climas tropicais e subtropicais, devido ao desenvolvimento de cultivares com diferentes graus de adaptação, fotoperíodos e aos sistemas de manejo (CALVETE et al., 2012). Possui grande aceitação pelo mercado consumidor, graças a sua atraente coloração, aromas e sabor agradáveis, além de suas propriedades nutracêuticas. A coloração do morango se deve às antocianinas e o seu sabor característico é relacionado aos ácidos cítrico e málico e aos açúcares (SILVA, 2006). O morango contém grande quantidade

de flavonoides, que são compostos fenólicos com atividade antioxidante cujo consumo está associado à prevenção da maioria das doenças crônicas de risco e degenerativas por combaterem os radicais livres.

Segundo dados da FAO (2016), os Estados Unidos apresentam-se como o maior produtor mundial seguido pelo México, Turquia, Espanha e Egito. O Brasil não está entre os maiores produtores. Entretanto, nos últimos anos, a produção de morango no país vem se tornando cada vez mais expressiva devido às condições climáticas propícias para o desenvolvimento da cultura (DALAGNOL, 2010). O estado de Minas Gerais é o maior produtor do Brasil, seguido por São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo, Santa Catarina, Goiás e Rio de Janeiro, além do Distrito Federal. A área de produção corresponde a 3,5 mil hectares (CALVETE et al., 2012) estando esses, na maioria, fragmentados em pequenas propriedades rurais familiares (SANTOS & MEDEIROS, 2003).

A Albion, cultivar de dia neutro é originária da Califórnia, cruzamento entre Diamante e seleção possui uma arquitetura mais aberta facilitando a colheita. Produção com poucos picos e melhor sabor comparado com as outras variedades de dia neutro. Os frutos apresentam excelente sabor, cor, tamanho e ótima produtividade. A San Andreas, cultivar de dia neutro, originária da Universidade da Califórnia, por cruzamento entre Albion e uma seleção. Fruto vermelho, ligeiramente mais leve que Albion e Aromas mais escuro que Diamante; grandes e longos, com peso médio de 31,6 g; firmeza e sabor semelhante a Albion; polpa mais escura e vermelha em comparação a Albion e mais vigorosa. Planta moderadamente resistente ao oídio, antracnose podridão da coroa, murcha de *Verticillium*, a podridão da coroa de *Phytophthora*, e mancha comum e tolerante a ácaro rajado. (ANTUNES et al., 2016).

O morangueiro é cultivado, em várias formas: no solo, com ou sem cobertura plástica, no sistema hidropônico ou semi-hidropônico, em túneis baixos ou em estufas. A função da cobertura plástica é proteger as plantas das chuvas, geadas e dos raios ultravioleta e reduzir a disseminação de pragas e doenças. A cobertura plástica pode ser feita em túneis baixos ou estufas plásticas. O uso da cobertura favorece o desenvolvimento adequado da cultura e do seu manejo fitossanitário. Neste caso, o morango é produzido em sistema protegido, onde é reduzida a incidência de pragas e doenças de parte aérea. Esta alternativa é de grande importância para os produtores, pois reduz a demanda de agrotóxicos na cultura e aumenta a rentabilidade da atividade. (BORTOLOZZO et al., 2005). O cultivo protegido vem sendo cada vez mais adotado pelos produtores no estado de Santa Catarina e também em outros estados, como medidas importantes no manejo de doenças foliares.

4.1.3 Mancha Angular de *Xanthomonas fragariae*

A mancha angular causada por *Xanthomonas fragariae* é uma das bacterioses mais importantes do morangueiro podendo ser limitante para a cultura em virtude da sua natureza devastadora, da susceptibilidade das cultivares mais utilizadas e da baixa eficácia das medidas de controle disponíveis. A bactéria foi detectada pela primeira vez no morangueiro na América do Norte em 1962 (KENNEDY E KING, 1962) sendo disseminada em várias áreas de cultivo de morango tais como: América do Norte e do Sul, Europa, África, Austrália e Nova Zelândia (MASS et al., 1995).

No Brasil, as primeiras observações da doença foram no Espírito Santo, com a introdução de mudas provenientes do estado de São Paulo (COSTA et al., 2006). É uma doença que afeta as folhas, no entanto, pode se tornar importante quando ocorre sob alta severidade, necrosando o limbo foliar e enfraquecendo a planta. A infecção geralmente ocorre pelos estômatos da planta e a disseminação se dá predominantemente através de respingos de chuva e pelos tratos culturais utilizados. Nas folhas, os sintomas se iniciam com pontos apenas visíveis na superfície abaxial, translúcidos contra a luz. Posteriormente os pontos tornam-se manchas angulares de 1 a 4 mm de tamanho, delimitadas pelas nervuras das folhas. Após duas a três semanas, as manchas adquirem formato irregular de coloração marrom-avermelhada. O patógeno sobrevive de um cultivo ao outro em lesões foliares que constituem a fonte de inóculo primária para a infecção. Os fatores ideais para o desenvolvimento da doença são: temperaturas diurnas de 20°C a 30 °C, baixas temperaturas noturnas e alta umidade relativa (HILDEBRAND et al., 1967; KENNEDY & KING 1962; MAAS et al., 1995; MAZZUCCHI et al., 1973; PANAGOPOULOS et al., 1978).

4.2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E ACIBENZOLAR-S-METIL

A proteção natural das plantas está baseada em uma série de barreiras pré-formadas e pós-formadas (TAIZ & ZEIGER, 2004). Barreiras estruturais pré-formadas são aquelas presentes na planta antes do contato com o patógeno e os pós-formados, estão ausentes ou em baixo nível antes da infecção sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno ou a um elicitador. Geralmente, essas categorias podem ser subdivididas em estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes, criando condições adversas a infecção do patógeno na planta (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

A indução de resistência envolve a ativação dos mecanismos de defesa latentes de uma planta (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997) que pode ser obtida pelo tratamento com agentes bióticos como microrganismos viáveis ou inativados (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994) ou abióticos como ácido salicílico (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997), ácido aminobutírico e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (HIJWEGNWN et al., 1996) e benzotiadiazólicos (FRIEDRICH et al., 1996). As respostas de defesas da planta resultam de estímulos provocados por elicitores. Os elicitores são moléculas de origem bióticas ou abióticas capazes de estimular qualquer resposta de defesa nas plantas (SMITH et al., 1996; STICHER et al., 1997). Os elicitores bióticos compreendem moléculas como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos. Os abióticos são representados por metais pesados (HgCl_2), luz ultravioleta, entre outros (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A resistência da planta está correlacionada com a ativação de vários mecanismos de defesa envolvendo a ativação da transcrição de numerosos genes, abertura de canais de íons, modificações do status de fosforilação das proteínas e ativação de enzimas pré-formadas para realizar modificações nos metabolismos primários e secundários. Além de moléculas sinalizadoras para assegurar a coordenação da resposta de defesa tanto temporalmente quanto espacialmente resultando em rápida contenção do patógeno (HAMMOND et al., 2000). A resposta de defesa das plantas pode ser também pelo acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI, 1998).

A indução de resistência é dividida em quatro etapas: reconhecimento, sinalização, transdução e ativação dos mecanismos de defesa das plantas. A primeira etapa de respostas de defesa ocorre por meio do reconhecimento do elicitor pela planta, seja na parte aérea ou nas raízes. Este reconhecimento provoca alterações na planta que culminam com a geração de um sinal primário que pode ser translocado para outros locais, resultando na síntese de substâncias relacionadas à patogênese, que podem atuar diretamente sobre o patógeno ou promover a ativação de mecanismos de defesa que estão latentes na planta (HAMMERSCHMIDT, 1999). Consequentemente, pode ocorrer a restrição no crescimento de patógenos, culminando em uma menor intensidade dos sintomas de doenças.

A ativação de mecanismos de defesa envolve uma série de alterações bioquímicas e estruturais na planta incluindo: formação de papilas, lignificação da parede celular, acúmulo do ácido salicílico, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), reação de hipersensibilidade (HR), aumento na expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), além do acúmulo de metabólitos antimicrobianos, tais como fitoalexinas. Várias são

as enzimas que estão relacionadas com a resistência induzida, tais como peroxidases, catalase, polifenoloxidasas, superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e quitinasas (ANTEROLA et al., 2002; HAMMERSCHIMIDT et al., 1999; NANDAKUMAR et al., 2001; SCHENK et al., 2000).

Quando uma planta é atacada por insetos ou patógenos, inicialmente ocorre uma “explosão oxidativa”, que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio (HU et al., 2009). São vários fatores que podem causar aumento dos níveis de EROs, radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, ataque de patógenos e insetos, injúrias, flutuações na temperatura (SCANDALIOS, 1997). A inativação efetiva das EROs depende da ação de uma série de enzimas trabalhando em sincronia. Dentre elas, as superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx). (GOLAN et al., 2013; RANI & PRATYUSHA, 2013).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa com os danos causados pelas EROs, a enzima atua dismutando o superóxido em peróxido de hidrogênio e água. A determinação da atividade da SOD considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto) (GIANNOPOLITIS Et al., 1977). Esta enzima fornece a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das espécies reativas de oxigênio (GILL & TUTEJA, 2010). As SOD removem O_2 , catalisando a sua dismutação, onde um O_2 é reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 . (MITTLER, 2002; GILL & TUTEJA, 2010). EHSANI-MOGHADDAM et al. (2006) observaram um aumento na atividade de SOD 2 dias após a inoculação do fungo *Mycosphaerella fragariae* em 3 cultivares de morango. Esse aumento de SOD poderia estar relacionado como uma estratégia da planta para restringir o desenvolvimento do fungo.

A catalase (CAT) é uma enzima responsável pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo este peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidos na oxidação de ácidos graxos, fotorespiração e catabolismo de purinas (GILL & TUTEJA, 2010). Esta enzima participa da principal via de degradação do H_2O_2 e, portanto, a inibição da CAT resultaria na ativação de respostas de defesa. Este sistema é ativado quando as plantas são atacadas, principalmente por fitopatogênicos no qual o seu crescimento é inibido na área infectada (GAYATRIDEVI et al., 2012).

Outros compostos que podem estar relacionados com as respostas de defesa das plantas são os compostos fenólicos ou polifenóis. Estes, são metabólitos secundários que

constituem um dos grupos mais comuns e generalizados de substâncias em plantas. Segundo HARBORNE (1989) podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático, com um (fenol) ou mais (polifenol) substituinte hidroxilo, incluindo derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos, etc). Estes compostos estão relacionados com a ativação de respostas de defesa vegetal. Os polifenóis são oxidados por enzimas chamadas polifenoloxidase e peroxidases e são importantes para a pigmentação, crescimento e reprodução das plantas (LATTANZIO; CARDINALI, 2006).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a primeira enzima que atua na síntese de compostos fenólicos, e sua atividade está diretamente envolvida na resposta à infecção por fitopatógenos. Faz parte da via metabólica de vários compostos de defesa das plantas, como a via metabólica do ácido salicílico. A FAL é uma enzima responsável pela desaminação da L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico. O ácido trans-cinâmico é incorporado em diferentes compostos fenólicos, como por exemplo, o ácido salicílico que gera precursores para a biossíntese de lignina e outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (ZHAO et al., 2005). Com isso, o aumento da atividade da FAL nas plantas tem sido apontado como um indicador de elicitação e indução de resistência, pois, um determinado elicitor pode induzir à síntese desta enzima e aumentar a concentração de compostos de defesa, como por exemplo, a de fitoalexinas. Além disso, a FAL é responsável pelo incremento na biossíntese de derivados fenilpropanóides com a produção de uma variedade de fenólicos com funções estruturais e de defesa, incluindo a formação de lignina, que confere às paredes celulares uma maior rigidez e resistência à degradação por enzimas secretadas pelo patógeno (BOLWELL et al., 1991; DEFFUNE, 2001; RIDE, 1980; SHERWOOD, 1980).

Alguns indutores já foram registrados e liberados para utilização na agricultura, como por exemplo, Oryzemat[®], [®], Messenger[®], 45 Oxycon[®] e Elexa[®] (DINIZ et al., 2006; FRANZENER et al., 2007; LUIZ et al., 2013; RESENDE et al., 2000). O ASM, ingrediente ativo do produto comercial Bion[®], considerado um indutor químico, possui a capacidade de induzir resistência em plantas a diversas espécies de fitopatógenos. Alguns pesquisadores demonstraram que quando aplicado preventivamente, ASM exibiu a capacidade de modificar o metabolismo de defesa vegetal em culturas como tomate (HACISALIHOGU et al., 2007; MALOLEPSZA, 2006), cacau (CAVALCANTI; RESENDE, 2005), melão (SALES JUNIOR; PONTES FILHO; NUNES, 2007), pimenta (BAYSAL; TURGUT; MAO, 2005), manga (CAZORLA et al., 2006) e pêsego (DANNER et al., 2008). O Acibenzolar-s-metil[®] é registrado para o controle de várias doenças em plantas, incluindo bacterioses provocadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* na cultura do algodão, *Xanthomonas*

axonopodis em Eucalipto, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria* em tomate (AGROFIT, 2016). No entanto, na cultura do morangueiro, o ASM não é registrado, porém alguns autores relataram a eficiência na redução da severidade da mancha-de-micosferela, flor-preta e mancha-dendrofoma (MAZARO, 2007). O ASM é um indutor análogo ao ácido salicílico, ativando genes que codificam proteínas PR e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (RESENDE et al., 2000).

4.3 UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas a partir de diferentes exsudados vegetais e muito utilizada na medicina para o controle de doenças desde a antiguidade, devido às suas propriedades antibacterianas, antiviral, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, anticancerígeno e outras propriedades biológicas (BANSKOTA et al., 2001; KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI et al., 2001; SFORCIN et al., 2000).

Nos últimos anos, constatou-se um grande aumento do número de apicultores no Brasil, aproveitando a extensa área territorial e a diversidade de plantas nectaríferas, poliníferas e propoliníferas. Isso ocasionou um aumento na produção da própolis nos últimos 10 anos, tornando-se o país o terceiro maior produtor mundial, chegando a 150 toneladas anuais. Desse volume, dois terços são destinados à exportação, principalmente ao Japão, Estados Unidos, Alemanha e China. O Japão é o principal importador deste produto apícola brasileiro, sendo que, 92% de toda a própolis in natura consumida é de origem brasileira (ABREU, 1998; MICHELIN, 2005; TOLEDO, 1997).

No Brasil, existe uma grande variedade de própolis, algumas são fibrosas e firmes, enquanto outras são gomosas e maleáveis. A composição química da própolis varia quantitativa e qualitativamente e está associada às características fitogeográficas da região de coleta e da estação do ano (BARTH et al., 2013). A coloração da própolis é dependente de sua procedência, podendo variar de verde ou marrom esverdeada, amarela, amarela escura, castanho escuro, castanho claro e mais recentemente a vermelha. A coloração está intrinsecamente associada à vegetação de origem e aos fatores ambientais do local de produção. O aroma forte característico da própolis é devido a uma fração volátil de ácidos fenólicos, podendo variar de uma amostra para outra (BANKOVA 2009; BURDOCK et al.,

1998; INOUE et al., 2007; MARCUCCI et al., 1996; 2001; PARK et al., 2000; SALATINO et al., 2005; TRUSHEVA et al., 2006).

Dentre vários tipos de própolis encontrados no Brasil, a de coloração verde é a que possui maior aceitação no mercado internacional, muito utilizada pelos importadores japoneses (LIMA, 2006). Produzida a partir dos ápices da planta alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), é encontrada no sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais, leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro (BANKOVA et al., 1999; BASTOS et al., 2001; PARK et al., 2002). Outro tipo de própolis que vem sendo estudado é a de coloração vermelha, produzida a partir de exsudados da planta rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), sendo encontrada em áreas de mangues de algumas regiões do Nordeste. Esta própolis, denominada de “própolis vermelha”, devido à coloração vermelha intensa, foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira. Além disso, essa própolis tem demonstrado várias atividades biológicas, principalmente atividade antimicrobiana em ensaios *in vitro*. A própolis marrom é mais popular e tem origem em uma grande diversidade de plantas oriundas da mata atlântica (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Várias amostras de própolis já foram caracterizadas e classificadas no país, onde avaliaram-se características físico-químicas e propriedades biológicas de própolis em diferentes regiões brasileiras (PARK et al., 2000). Mais de 300 componentes diferentes já foram isolados em diferentes amostras de própolis, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides, terpenos, β -esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno. Entre as substâncias isoladas, polifenóis especialmente os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), são os principais responsáveis pelas atividades antibacterianas, antioxidante, anti-inflamatório, entre outras propriedades encontradas na própolis (AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 1995; GHISALBERT et al., 1977; GREENAWAY et al., 1991; MARCUCCI et al., 1996, 2001). Além disso, a própolis tem seu uso permitido no sistema de produção orgânico para o controle de doenças em plantas.

Estudos demonstram que a própolis tem potencial para controlar doenças em plantas via a aplicação foliar de extrato etanólico (MARINI et al., 2012). PEREIRA et al. (2008) observaram redução da severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro, e da incidência e severidade da ferrugem em cafeeiros no campo com a aplicação foliar de extrato etanólico de própolis. E também apresentou efeito antimicrobiano sobre algumas bactérias fitopatogênicas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia chrysanthemi* e

Xanthomonas axonopodis (BIANCHINI et al., 1998). Esses resultados demonstram que as bactérias fitopatogênicas podem ser sensíveis às substâncias antibióticas presentes na própolis. Porém, mais estudos devem ser realizados para se avaliar os efeitos potenciais de extratos de própolis sobre o controle de doenças de plantas e na viabilidade de seu uso na agricultura.

4.4 UTILIZAÇÃO DO COGUMELO SHIITAKE (*Lentinula edodes*) NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

O cogumelo *Lentinula edodes*, conhecido como shiitake, pertence ao Filo Basidiomycota, Ordem Agaricales e Família Marasmiaceae. É um fungo filamentoso, aeróbio e saprofítico, possui micélio septado, e se reproduz por basidiosporos formados sobre uma hifa especial denominada basídia. (MOORE-LANDECKER, 1982).

O cultivo do shiitake originou-se na China, vindo a ser introduzido no Japão por intervenção dos produtores chineses e sucessivamente introduzido nos Estados Unidos e Europa (PAULA, TARSITANO; GRACIOLLI, 2001). É o segundo cogumelo comestível mais cultivado e consumido no mundo, ficando atrás apenas do “champignon” de Paris (*Agaricus bisporus*) (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990). No Brasil, o cultivo está centralizado basicamente nas regiões sul e sudeste. Os cultivos do cogumelo de shiitake geralmente são em tronco de madeiras como o eucalipto, carvalho, mangueira e abacateiro. O interesse pela produção desse cogumelo é devido principalmente às suas qualidades gastronômicas, nutricionais e medicinais (PASCHOLATI, STANGARLIN, PICCININ, 1998). A sua composição é constituída basicamente de proteínas, carboidratos, vitaminas, mineirais e gorduras. (ISHIKAWA et al., 2001;).

Devido à demanda de cogumelos padronizados para o mercado consumidor é gerado uma grande produção residual de “cogumelos irregulares e deformados”, que geralmente são inutilizados. Esses resíduos ao invés de aumentar os custos para o recolhimento, tratamento e eliminação poderiam ser utilizados para extração de subprodutos, como o caso de polissacarídeos (AGUIAR et al., 2016). Resultados promissores com cogumelos, algas, e seus polissacarídeos no controle de doenças em plantas contra fitopatógenos já foram documentados (DI PIERO et al., 2003; LUIZ et al.2016).

Alguns trabalhos demonstram resultados satisfatórios com o uso de *L. edodes* no controle de bacterioses em plantas. De acordo com PACUMBABA et al. (1999), o lixiviado micelial de *L. edodes* preveniu a murcha bacteriana provocada por *R. solanacearum*. Além

disso, preveniu também a murcha de feijão-lima provocada por *C. flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. De acordo com PICCININ (2000), a lentinana, uma glucana obtida a partir de *L. edodes*, protegeu plantas de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* sem apresentar efeito direto sobre a bactéria, indicando que a proteção provavelmente ocorreu através da indução de resistência. No trabalho de AGUIAR al. (2018), a aplicação foliar preventiva do polissacarídeo extraído da biomassa fúngica do *L. edodes* (1,5 mg mL⁻¹) reduziu a severidade da mancha bacteriana do tomateiro (*X. gardneri*) em cerca de 57% e aumentou a atividade da fenilalanina amônia-liase e o teor flavonoides nas folhas tratadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC), onde os experimentos com plantas foram conduzidos em casa de vegetação e os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia.

5.1 CULTIVO DO MORANGUEIRO E OBTENÇÃO DO INÓCULO

Mudas de morangos das cultivares Albion e San Andreas foram compradas da Patagônia (Argentina) através da empresa Patagonia Agricola S.A. (CUIT 30-70934053-7) e transplantadas em vasos com capacidade de 2 litros contendo substrato à base de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas e adubadas manualmente de acordo com suas necessidades hídricas e nutricionais. As temperaturas (máxima, mínima e atual) no interior da casa de vegetação foram registradas diariamente.

O isolado (ATCC 33239) de *Xanthomonas fragariae* foi adquirido da Coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), sendo armazenado no Laboratório de Fitopatologia da UFSC em glicerol (30%) a -80 °C. Para a realização dos experimentos, a bactéria passou por um processo de descongelamento gradual (4 horas a -20 °C; 4 horas a 4 °C; e à temperatura ambiente por 15 minutos). Em seguida, 100 µL do isolado foram pipetados sobre o meio de cultura YSG (composição, g/L: extrato de levedura, 5,0; glicose, 5,0; fosfato de amônio monobásico, 0,5; fosfato de potássio dibásico anidro, 0,2; ágar 18,0) e espalhados por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drygalski. As placas

de petri foram incubadas a $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ no escuro em câmara de crescimento por 5 dias. Para os experimentos, as suspensões bacterianas foram ajustadas com água destilada em espectrofotômetro para 0,3 unidades de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL.

5.2 PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS

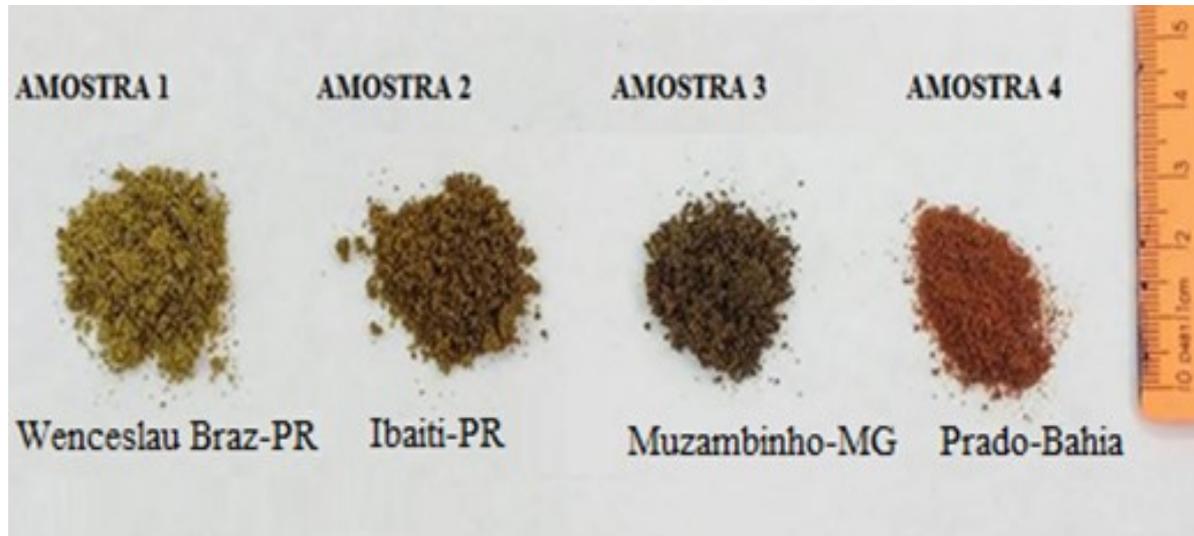
Foram utilizadas quatro amostras de própolis de diferentes estados do Brasil, conforme a Tabela 1: duas fontes de própolis verde, as quais foram coletadas nos municípios de Ibaiti e Wenceslau Braz, no estado do Paraná; própolis marrom, coletada a partir da região da Zona da Mata, no município Muzambinho do estado de Minas Gerais (essas 3 amostras foram fornecidas pela empresa Prodapys, de Araranguá, Santa Catarina); e a própolis vermelha, adquirida de um apiário no município de Prado do estado da Bahia. As amostras foram armazenadas sob temperatura ambiente até a preparação dos extratos hidroalcoólicos.

No laboratório, as amostras foram trituradas em almofariz mediante a adição de nitrogênio líquido e com auxílio de um triturador, sendo em seguidas peneiradas até a obtenção de um pó e armazenadas a temperatura ambiente. De cada fonte, o extrato hidroalcoólico foi preparado a partir da adição de etanol 70% na proporção de 4 mL de etanol para 1g de própolis. O material foi transferido para um frasco âmbar a temperatura ambiente e, após 48 h, filtrado a vácuo até a obtenção dos extratos hidroalcoólicos, armazenados sob refrigeração a 4°C . Para a determinação da concentração de matéria seca (MS) presente em cada extrato, alíquotas de 1 mL dos extratos foram pesadas em balança analítica, secas em estufa a 60°C até o peso constante e novamente pesadas (ORDOÑEZ et al., 2010).

Tabela 1 - Amostras de própolis coletadas em diferentes municípios do Brasil e empregadas nesse estudo.

Amostras	Coloração	Local de coleta	Siglas
Amostra 1	Própolis Verde	Wenceslau Braz-PR	PVERD1
Amostra 2	Própolis Verde	Ibaiti-PR	PVERD2
Amostra 3	Própolis Marrom	Muzambinho-MG	PMARR
Amostra 4	Própolis Vermelha	Prado-BA	PVERM

Figura 1 - Amostras de própolis coletadas em diferentes municípios do Brasil.



Fonte: a autora (2017).

5.3 PREPARO DOS EXTRATOS DO POLISSACARÍDEO DO SHIITAKE

Os basidiocarpos de *Lentinula edodes* (cogumelo shiitake) considerados de baixa aceitação para o mercado consumidor foram fornecidos pelo Dr. Márcio José Rossi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Santa Catarina Universidade Federal, Brasil). Para a obtenção do extrato aquoso bruto, os cogumelos (500 g) foram fatiados e receberam 1,5 L de água destilada (1:3, substrato/água). A suspensão passou por um processo de autoclavagem de 30 minutos a 121 °C, e após o resfriamento, filtrou-se em dupla camada de gaze esterilizada, obtendo-se o extrato (PARADA et al., 2012). Esse extrato aquoso bruto foi submetido à precipitação etanólica (80%) na proporção etanol: extrato 1:1 (v/v) por um período de 24 h a -20 °C (PAULERT et al., 2009; HAHN e ALBERSHEIM, 1978). Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e a fração de polissacarídeos foi seca em estufa a 45 °C por 3 dias até atingir um peso constante. Posteriormente, a fração polissacarídica foi triturada e armazenada a -20 °C (AGUIAR et al., 2016).

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS

Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram parcialmente caracterizados quanto ao teor de compostos fenólicos e flavonoides. Para a quantificação de compostos fenólicos totais, 10 μL dos extratos hidroalcoólicos das diferentes fontes de própolis a (5 mg/mL) foram adicionados individualmente em eppendorfs e misturados com 600 μL de uma solução de Reagente Folin-Ciocateu (0,2 N). Em seguida, foram adicionados 500 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio a 5%. Após 1 hora de incubação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 765nm (SPANOS & WORLSTAD,1990). Os resultados foram expressos em termos de equivalente-ácido gálico utilizando-se uma curva padrão de ácido gálico construída na faixa de (0-500 $\mu\text{g/mL}$).

Para a quantificação do teor de flavonóides, 10 μL de extratos hidroalcoólicos das diferentes fontes de própolis a 5mg/mL (massa de matéria seca / volume de etanol) foram adicionados individualmente em tubos falcon e misturados com 300 μL de nitrato de alumínio a 2% e 300 μL de etanol a 99%. Após 1h de incubação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 420 nm (NIEVA MORENO et al., 2000). Os resultados foram expressos em termos de equivalente-quercetina entre (0 a 400 $\mu\text{g/mL}$).

5.5. EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Inicialmente, 100 μL de extrato de própolis (PVERD1 1,0 mg/mL), suspensão do polissacarídeo extraído do shiitake (PSHII 1,0 mg/mL) e Acibenzolar-s-metil (ASM 25ppm) foram pipetados e espalhados sobre a superfície do meio cultura YSG. Em seguida, uma suspensão bacteriana de *X. fragariae* a 0,3 unidades de absorbância a 600 nm foi diluída 10.000 vezes em água destilada estéril, e 50 μL da diluição resultante foram adicionados à superfície do meio de cultura e espalhados. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. Como controles foram utilizadas utilizados a água destilada estéril e etanol 0,01%. A avaliação foi realizada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) presentes na superfície do meio de cada placa e foram feitas cinco repetições por tratamento.

Para avaliar o efeito dos compostos sobre a formação do biofilme bacteriano, foi utilizada a metodologia de LAZAREVIC et al. (2005) com adaptações. Logo, 150 μL do meio YSG foram adicionados individualmente em poços de uma microplaca. Em seguida foram pipetados 50 μL da suspensão de PVERD1, PSHII ou ASM de modo que as concentrações

finais foram de 1,0 mg/mL; 1,0 mg/mL e 25 ppm, respectivamente. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de uma suspensão bacteriana de *X. fragariae* (0,01 unidades de absorvância a 600 nm) e a solução foi homogeneizada. A microplaca foi incubada a 25°C sem agitação, e após 7 dias, os sobrenadantes foram removidos e a microplaca incubada a 70°C. Após 20 minutos, as células das bactérias aderidas a microplaca foram coradas com safranina 0,5% por 5 minutos e o excesso de corante removido com água destilada. Por fim, foram adicionados 150 µL de etanol 70% - citrato de sódio 0,1 M (1:1) e a absorvância lida a 492 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax® Paradigm Multi-Mode, Microplate Reader). Como controle foram utilizados água destilada estéril e o etanol 0,01%. Os resultados foram expressos em unidades de densidade óptica a 492 nm e foram realizadas cinco repetições por tratamento.

5.6 EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE A SEVERIDADE DA MANCHA ANGULAR

Em um teste preliminar, quatro diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2) a 5 mg/mL (base de matéria seca) foram comparados com calda bordalesa CAB a 1%, suspensão de polissacarídeo do cogumelo shiitake (PSHI, 3 mg / mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) para o controle da mancha angular. As doses dos produtos foram baseadas em pré-testes.

Posteriormente, plantas de morango com três folhas definitivas da cultivar (Albion) foram pulverizadas com os produtos (8 mL) até o ponto de escorrimento, aos 3 ou 6 dias antes da inoculação. Para a inoculação, as plantas foram pulverizadas com 10 mL de uma suspensão de *X. fragariae* a 0,3 unidades de absorvância a 600 nm, correspondente a 10⁸ UFC/mL. Em seguida, as plantas foram transferidas para câmara úmida a 28° C por 48 h. Como testemunha foram utilizadas a água destilada e o etanol a 0,01%. A avaliação da severidade da doença (% da área foliar lesionada) foi realizada aos 15, 22 e 29 dias após a inoculação do patógeno, com o auxílio de uma escala feita com o software *Quant* (VALE et al., 2003; LUIZ et al., 2013).

Os testes de proteção de plantas foram realizados também com uma outra cultivar. Plantas de morango da cultivar San Andreas foram pulverizadas com 8 mL de água destilada, PSHI a 3 mg / mL, PVERD1 a 5mg/mL ou ASM 25 ppm quando essas apresentavam três folhas definitivas. Após 3 dias, foi feita a inoculação da bactéria, pulverizando-se 10 mL de uma suspensão de *X. fragariae* a uma concentração de 10⁸ UFC/mL. A câmara úmida e a avaliação da severidade da doença foram realizadas da maneira descrita anteriormente.

5.7 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA EM MORANGUEIROS

Nos experimentos realizados com a cultivar San Andreas, foram coletadas folhas nos tempos 0, 3, e 5 dias após a aplicação dos produtos. Após a coleta do terceiro dia, 50% das plantas previamente tratadas foram inoculadas com *X. fragariae* a 10^8 UFC/mL e as plantas restantes foram pulverizadas com água destilada. Para as análises bioquímicas foram realizadas cinco repetições por tratamento e cada repetição foi constituída por três folhas coletadas a partir de uma planta. As amostras foliares foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e maceradas, realizando-se um (pool), e armazenadas em ultra freezer – 80 °C, até serem processadas para as diferentes análises bioquímicas (LUIZ et al., 2015).

5.7.1 Fenilalanina amônia-liase

Para a determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), foi utilizado o método de FALCÓN et al. (2008), com adaptações. Em 500 mg do tecido foliar previamente macerado em nitrogênio líquido foram adicionados 1,5 mL de tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8) contendo EDTA 1 mM e PVP (0,5 %). Logo, as amostras foram centrifugada a (20 000 g, 20 min, 4 ° C) e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado. Para a reação, foram pipetados 15 µL de extrato proteico acrescentando 450 µL de fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8) e incubadas em banho maria a 40 ° C por 1 h. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCL (5 N) e os tubos foram transferidos imediatamente para banho de gelo por 5 minutos acrescentando 300 µL de água destilada. As leituras espectrofotométrica foram realizadas a 290 nm e os resultados foram expressos como nmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (nmol de ácido trans-cinâmico / mg de proteína / min). O conteúdo total de proteínas foi mensurado de acordo com o método de Bradford (1976).

5.7.2 Atividade de surperóxido dismutase e catalase

Para o preparo do extrato, 500 mg de tecido foliar previamente macerado em nitrogênio líquido foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM

(pH 6,0) e centrifugado à (20 000 g, a 4° C por 20 min) e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado.

A determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD) foi realizada pela adição de 20 µL de extrato proteico a 1,5 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 13 mM de metionina, 75 mM nitroblue tetrazolium - NBT, 100 mM de etilenodiamina ácido tetraacético - EDTA e 2 mM de riboflavina. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos (luz fluorescente 15 watts) a uma temperatura de 25 ° C. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela remoção da luz. O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560nm. Os tubos considerados brancos para análise receberam os mesmos reagentes, porém foram cobertos com papel alumínio e abrigados da luz durante a incubação. Uma unidade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima que causou uma inibição de 50% da fotoredução do NBT. Os resultados foram expressos em proteína U / µg. O conteúdo total de proteínas foi mensurado de acordo com o método de Bradford (1976).

A determinação da atividade da catalase (CAT) foi realizada pela adição de 30 µL do extrato proteico em uma solução contendo 270 µL de tampão de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 50 mM). A atividade de CAT foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a 240 nm durante 3 minutos a cada 30 segundos. A atividade foi expressa em Unidade CAT / min / mg de proteína. Uma unidade CAT foi considerada a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,01 unidades de absorvância (adaptado de PARIDA & MOHANTY, 2004).

5.7.3 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides

A quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides em folhas de morango foi realizada de acordo com MCCUE et al. (2000). Primeiramente adicionaram-se 3 mL de metanol 80 % acidificado (pH 2,0) a 150 mg do tecido foliar previamente macerado em nitrogênio líquido. A mistura obtida foi centrifugada a 20.000 g, 20 min, 4° C, e o sobrenadante recuperado (extrato foliar).

A quantificação do conteúdo de compostos fenólicos totais (FENOIS) foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, com adaptações (SINGLETON et al., 1999). Em 0,5 mL de extrato foliar foram adicionados 0,5 mL de metanol 95 % (v/v). Então, a essa mistura foram adicionados 1 mL de etanol 95 %, 1 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de Folin-

Ciocalteu. Após 5 min, foi adicionado 1 mL de Na₂CO₃ (5% m / v) e as amostras foram incubadas no escuro por 1 h em temperatura ambiente. Por fim, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 725 nm, e a quantificação de compostos fenólicos foi baseada em uma curva padrão (0,0 - 300 µg/ mL) de ácido gálico. Os resultados finais foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por g de massa fresca (mg EAG / g MF) (MCCUE et al., 2000).

5.7.4 Flavonoides

Para a quantificação do conteúdo de flavonoides (FLAVO), a reação ocorreu pela adição de 20 µL de extrato em 240 µL de etanol 99% e 20 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% em poços de placas de poliestireno, as quais foram imediatamente incubadas no escuro, a temperatura ambiente por 1 h. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 420 nm. A quantificação de flavonóides foi baseada em uma curva padrão (0,0 - 100 µg/ mL) de quercetina e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por g de massa fresca (mg EQ / g MF) (LUIZ et al., 2013).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos realizados em casa de vegetação foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo uma planta, com seis repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey ao nível de 5 % de significância.

Os experimentos realizados *in vitro* foram montados sob o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo que uma repetição foi constituída por uma placa de Petri, ou um poço de uma microplaca. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey a 5 % de significância. Todas as análises foram conduzidas utilizando o software estatístico Statistica 8.0.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FONTES DE PRÓPOLIS

As fontes de própolis verde (PVERD1 e PVERD2) apresentaram maiores conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides em comparação aos extratos PVERM (própolis

vermelha) e PMARR (própolis marrom). Por outro lado, observou-se que a amostra PMARR apresentou baixo teor de flavonoides avaliados no período de amostragem (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantificação de massa fresca, compostos fenólicos e flavonoides a partir de quatro fontes de extrato hidroalcoólico, de própolis verde (PVERD1 e PVERD2), própolis vermelha (PVERM) e própolis marrom (PMARR).

Fontes de Própolis	Massa seca (mg/ mL)	Compostos fenólicos totais (mg/ mL)	Flavonoides (mg/ mL)
PVERD1	132,4 ± 11,7 a	111,0 ± 0,02 a	30,8 ± 0,01 a
PVERM	120,4 ± 11,5 a	67,8 ± 0,10 b	26,1 ± 0,01 bc
PVERD2	80,3 ± 9,4 b	101,0 ± 0,10 a	28,6 ± 0,02 ab
PMARR	63,8 ± 10,5 b	70,9 ± 0,10 b	21,8 ± 0,01 c

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

7.2 ENSAIOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS

Nos testes com plantas da cv. Albion, os quatro extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2), a 5 mg/mL) reduziram significativamente a severidade (%) da doença quando aplicados 3 e 6 dias antes da inoculação com a bactéria em comparação com plantas pulverizadas com água destilada ou etanol 0,01%. A fonte de própolis verde proveniente da planta de origem *Baccharis dracunculifolia* (PVERD1) propiciou os menores valores médios na severidade da doença (Tabelas 3 e 4) promovendo uma redução média de 72 %. Os menores níveis de doença, em termos gerais, foram observados em plantas tratadas com o indutor comercial ASM, especialmente quando aplicado aos 6 dias antes da inoculação (d.a.i), reduzindo a doença em 82 % (Tabela 3). A calda bordalesa (CAB 1%) reduziu significativamente a severidade da doença apenas quando aplicada aos 3 d.a.i (Tabela 3). Por outro lado, o polissacarídeo de shiitake (PSHII) foi mais eficiente em reduzir a severidade da doença quando aplicado aos 6 d.a.i em comparação aos 3 d.a.i (Tabelas 3 e 4). No experimento realizado com a cultivar Albion (setembro de 2016), a média da temperatura máxima foi de 24° C e da mínima de 15° C, a temperatura média do período foi de 19° C.

Tabela 3- Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 15, 22 e 29 dias após a inoculação, em plantas de morango (cultivar Albion) tratadas com água destilada ou álcool 0,01% (controles), calda bordalesa (CAB 1%), suspensão de polissacarídeo do shiitake (PSHII, 3 mg / mL), extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2, a 5mg/mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 3 dias antes da inoculação.

	Dias após a inoculação com <i>Xanthomonas fragariae</i> (d.a.i)			
	15(d.a.i)	22(d.a.i)	29(d.a.i)	AACPD
H2O	10,2 ± 1,8 b	21,2 ± 7,0 a	25,3 ± 4,1 ab	350,3 ± 65,2 ab
Álcool	16,1 ± 4,3 a	21,8 ± 6,5 a	29,7 ± 4,9 a	434,6 ± 106,3 a
CAB	0,6 ± 0,7 c	4,8 ± 3,6 bc	8,0 ± 1,5 de	69,0 ± 33,2 cd
PSHII	8,2 ± 2,1 b	12,2 ± 2,3 ab	17,5 ± 3,1 bc	237,7 ± 38,0 bc
ASM	0,8 ± 0,64 c	6,1 ± 4,7 bc	9,6 ± 1,1 cd	84,8 ± 43,4 d
PVERM	3,0 ± 1,4 c	5,2 ± 3,0 bc	6,8 ± 1,6 de	93,8 ± 31,9 d
PMARR	1,1 ± 1,4 c	9,6 ± 3,8 bc	12,8 ± 5,2 cd	124,8 ± 58,5 cd
PVERD1	0,1 ± 0,2 c	0,7 ± 0,9 c	1,37 ± 1,1 e	11,4 ± 4,6 e
PVERD2	2,2 ± 1,3 c	8,7 ± 2,2 bc	11,1 ± 4,0 cd	124,9 ± 15,7 cd

*Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram obtidos de *Dalbergia ecastophyllum* (própolis vermelha - PVERM), plantas da mata Atlântica (própolis marrom - PMARR) e *Baccharis dracunculifolia* (própolis verde - PVERD1 e PVERD2). Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 15, 22 e 29 dias após a inoculação, em plantas de morango (cultivar Albion) tratadas com água destilada ou álcool 0,01% (controles), calda bordalesa (CAB 1%), suspensão de polissacarídeo do shiitake (PSHII, 3 mg / mL), extratos hidroalcoólicos de própolis (PVERM, PMARR, PVERD1 e PVERD2 -5mg/mL), e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 6 dias antes da inoculação.

	Dias após a inoculação com <i>Xanthomonas fragariae</i> (d.a.i)			
	15(d.a.i)	22(d.a.i)	29(d.a.i)	AACPD
H2O	16,1 ± 4,0 ab	22,5 ± 3,6b	42,2 ± 3,3 ab	482,7 ± 65,8b
Álcool	23,7 ± 2,3 a	38,0 ± 4,5 a	47,6 ± 4,1 a	693,9 ± 41,6a
CAB	18,2 ± 2,3 bc	20,8 ± 2,3b	30,3 ± 5,7 bc	482,7 ± 35,2b
PSHII	11,7 ± 5,3 c	15,8 ± 5,1 bc	22,2 ± 7,0 c	318,2 ± 115,1 b
ASM	0,15 ± 0,3 d	5,3 ± 4,4 c	7,5 ± 4,0 d	65,5 ± 47,8 c
PVERM	12,8 ± 2,8 c	24,1 ± 3,4 b	25,6 ± 0,75 c	400,1 ± 50,8 b
PMARR	9,5 ± 4,3 c	16,5 ± 5,2 bc	22,6 ± 5,7 c	299,1 ± 99,3 b
PVERD1	7,25 ± 4,9 c	20,8 ± 5,4 b	21,1 ± 8,4 c	310,3 ± 148,1 b
PVERD2	9,25 ± 4,1 c	20,25 ± 6,5 b	22,0 ± 6,0 c	320,5 ± 102,3 b

*Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram obtidos de *Dalbergia ecastophyllum* (própolis vermelha - PVERM), plantas da mata Atlântica (própolis marrom - PMARR) e *Baccharis dracunculifolia* (própolis verde - PVERD1 e PVERD2). Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Plantas de morangueiro da cultivar San Andreas, tratadas com o polissacarídeo do cogumelo shiitake ou com ASM apresentaram severidades da bacteriose significativamente menores que as da testemunha aos (21 dias), o mesmo ocorrendo para a área abaixo da curva

de progresso da doença, AACPD. A redução média foi de 30 e 34 %, respectivamente para PSHII e ASM (Tabelas 5 e 6). A fonte de própolis verde PVERD1 só reduziu significativamente a severidade da doença na primeira avaliação, aos 7 dias após a inoculação. Mesmo assim, plantas tratadas com essa fonte apresentaram menor AACPD em relação à testemunha (Tabela 5). Na última data de avaliação realizada, no 21º dia após a inoculação, o ASM diminuiu quase 40% da severidade da doença, enquanto o polissacarídeo do shiitake reduziu a severidade em aproximadamente 30 % (Tabela 5). Nos dois experimentos realizados com a cultivar San Andreas (novembro de 2017), a média de temperatura máxima foi de 35° C e mínima de 22° C, a temperatura média do período foi de 28° C.

Tabela 5 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) 7, 14 e 21 dias após a inoculação das plantas de morango (cultivar San Andreas) tratadas com água destilada (controle), extrato hidroalcoólico de própolis PVERD1 (5mg/mL), suspensão de polissacarídeo do Shiitake (PSHII, 3 mg / mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm) 3 dias antes da inoculação.

	Dias após a inoculação com <i>Xanthomonas fragariae</i> (d.a.i)			
	07(d.a.i)	14(d.a.i)	21(d.a.i)	AACPD
Água	20,8 ± 2,9 a	41,8 ± 4,1 a	61,0 ± 3,8 a	652,1 ± 28,2 a
PVERD1	15,6 ± 2,3 b	36,8 ± 5,1 a	56,1 ± 10,7 a	564,0 ± 25,1 b
PSHII	13,1 ± 3,1 b	28,3 ± 6,4 b	43,6 ± 6,4 b	443,3 ± 39,6 c
ASM	5,5 ± 3,0 c	20,8 ± 4,0 b	36,5 ± 3,7 b	312,0 ± 60,6 d

*Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No segundo experimento, plantas de morangos tratadas com PSHII e ASM novamente reduziram significativamente a severidade da doença em comparação à testemunha. Contudo, a severidade nas plantas tratadas com PVERD1 não diferiu estatisticamente da testemunha. Na última data de avaliação realizada, no 21º dia após a inoculação, o polissacarídeo PSHII diminuiu em quase 30 % a severidade da doença, enquanto o ASM reduziu a severidade em aproximadamente 27 % (Tabela 6).

Tabela 6 - Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*), 7, 14 e 21 dias após a inoculação das plantas de morango (cultivar San Andreas) tratadas com água destilada (controle), extrato hidroalcoólico de própolis PVERD1 (5mg/mL), suspensão de polissacarídeo do Shiitake (PSHII, 3 mg / mL) e Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), 3 dias antes da inoculação.

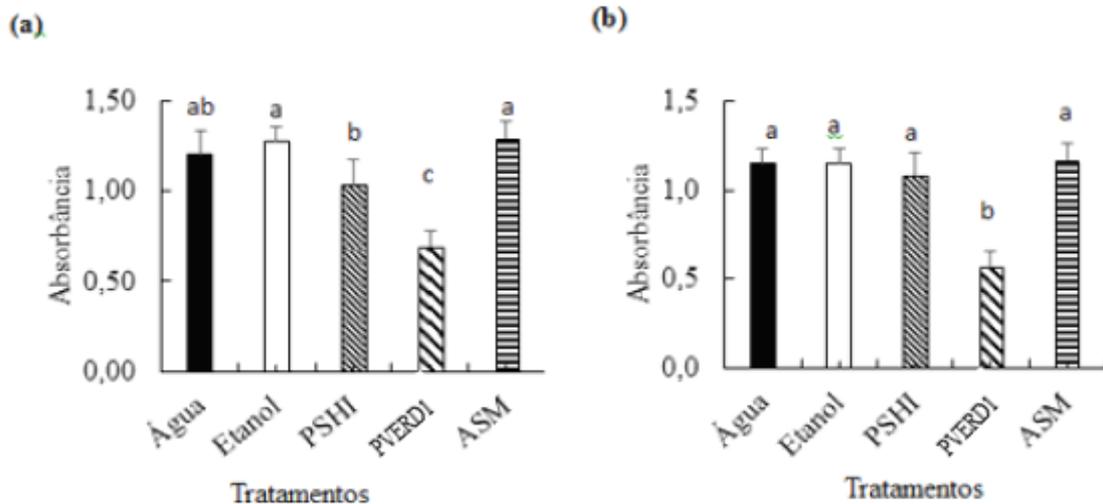
	Dias após a inoculação com <i>Xanthomonas fragariae</i> (d.a.i)			
	07(d.a.i)	14(d.a.i)	21(d.a.i)	AACPD
Água	9,40 ± 2,4 a	33,60 ± 6,1 a	53,60 ± 8,2 a	488,6 ± 87,2 a
PVERD1	8,67 ± 2,4 a	27,83 ± 2,8 ab	49,50 ± 3,3 a	409,0 ± 39,8 a
PSHII	5,50 ± 2,0 a	22,50 ± 2,1 bc	36,50 ± 2,7 b	323,7 ± 41,8 b
ASM	8,50 ± 3,0 a	20,67 ± 3,6 c	38,00 ± 3,0 b	336,0 ± 50,2 b

*Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

7.3 EFEITO DOS PRODUTOS SOBRE A FORMAÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO

Entre os produtos avaliados, apenas a fonte de própolis PVERD1 inibiu a formação de biofilme bacteriano, nos dois experimentos realizados. A inibição média foi em torno de 50 % em relação aos controles. PSHII e o ASM não diferiram estatisticamente dos controles, água destilada e etanol 0,01% (Figura 2a e 2b).

Figura 2 - Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (PVERD1 1,0 mg/ mL), do polissacarídeo extraído do shiitake (PSHII 1,0 mg/mL) e do Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), sobre a formação de biofilme da bactéria (*Xanthomonas fragariae*), em dois experimentos distintos. Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%



Em relação ao efeito dos produtos sobre o número de unidades formadoras de colônia (UFC) da bactéria (*Xanthomonas fragariae*), novamente apenas o extrato hidroalcoólico de própolis PVERD1 inibiu significativamente o número de UFC em relação às testemunhas, após 7 dias de incubação (Tabela 7). A inibição foi de 100% nos dois experimentos. No entanto, não foi observado qualquer efeito inibidor significativo do PSHII (polissacarídeos de corpos de frutificação *L. edodes*) e ASM (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (PVERD1 1,0 mg/ mL), da suspensão do polissacarídeo do shiitake (PSHII 1,0 mg/mL) e do Acibenzolar-S-metil (ASM 25 ppm), sobre o número de unidades formadoras de colônia da bactéria (*Xanthomonas fragariae*), em dois experimentos distintos. Avaliação realizada 7 dias após a incubação.

TRATAMENTOS	UFC		UFC	
	(Experimento1)		(Experimento2)	
Água	$0,6 \times 10^8 \pm 6$	a	$0,7 \times 10^8 \pm 10$	a
Etanol 0,01%	$0,7 \times 10^8 \pm 4$	a	$0,6 \times 10^8 \pm 9$	a
PSHII	$0,7 \times 10^8 \pm 8$	a	$0,6 \times 10^8 \pm 11$	a
ASM	$0,7 \times 10^8 \pm 12$	a	$0,6 \times 10^8 \pm 7$	a
PVERD1	0 ± 0	b	0 ± 0	b

*Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

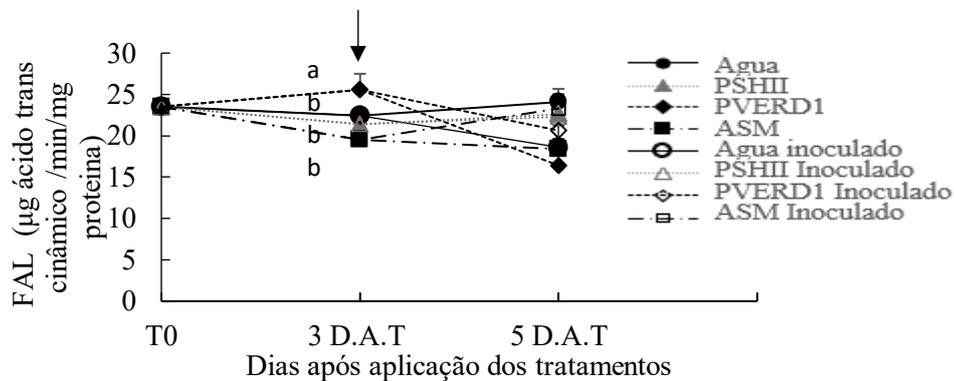
7.4 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE DEFESA

7.4.1. Fenilalanina amônia-liase - FAL

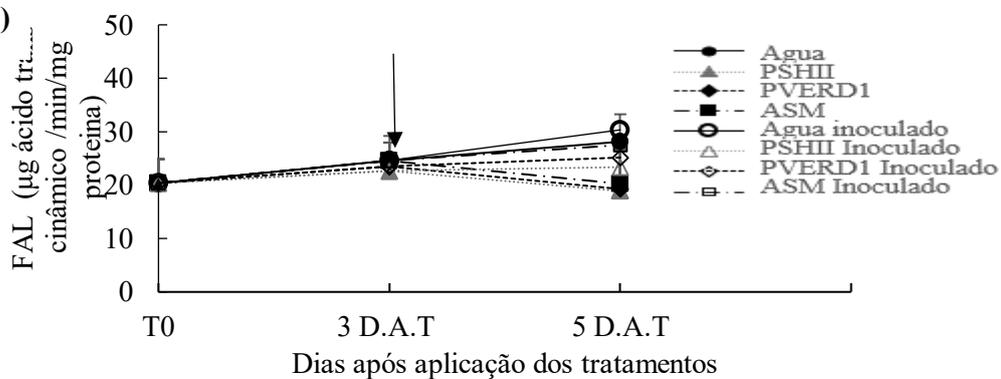
No primeiro experimento, plantas tratadas com PVERD1 apresentaram maiores atividades da fenilalanina amônia-liase aos 3 dias após a aplicação (Figura 3a). Por outro lado, não foi observada qualquer diferença significativa entre os tratamentos no segundo experimento. (Figura 3b)

Figura 3 - Atividade de fenilalanina amonia-liase em plantas de morango da cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (△) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

(a)



(b)

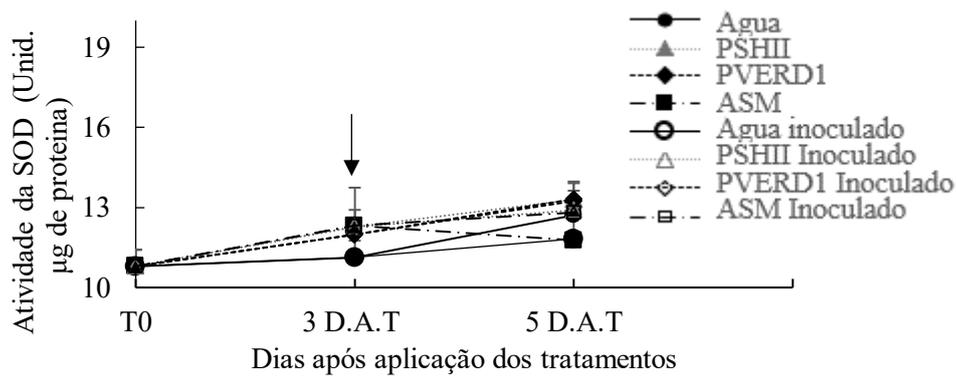


7.4.2. Superóxido dismutase - SOD

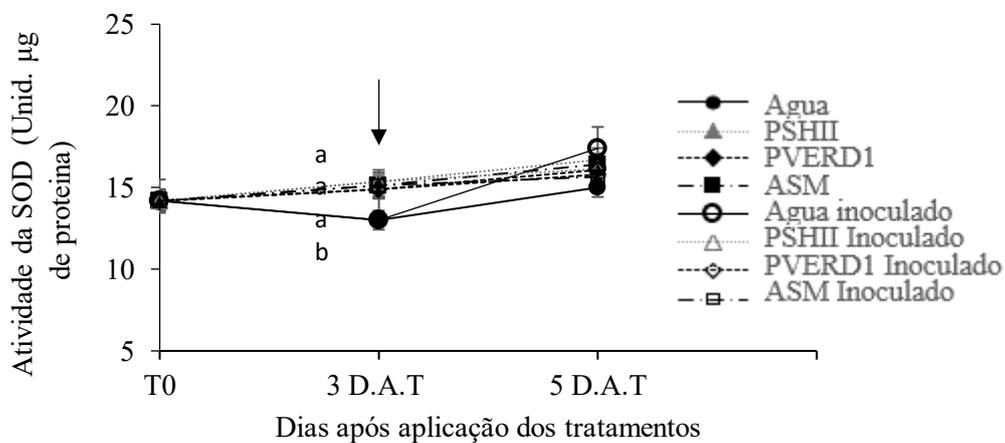
Logo antes da inoculação das plantas, nas amostras coletadas no terceiro dia após a aplicação dos produtos, pôde se observar que as plantas tratadas com ASM, PSHII e PVERD1 apresentaram maiores atividades de superóxido dismutase em relação às plantas tratadas apenas com água destilada. Isso aconteceu nos dois experimentos, com diferenças significativas encontradas no segundo experimento (Figuras 4a e 4b). Por outro lado, aos 5 dias após a aplicação dos tratamentos (5 DAT) não foi possível observar diferenças entre os tratamentos.

Figura 4 - Atividade de superóxido dismutase em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

(a)



(b)

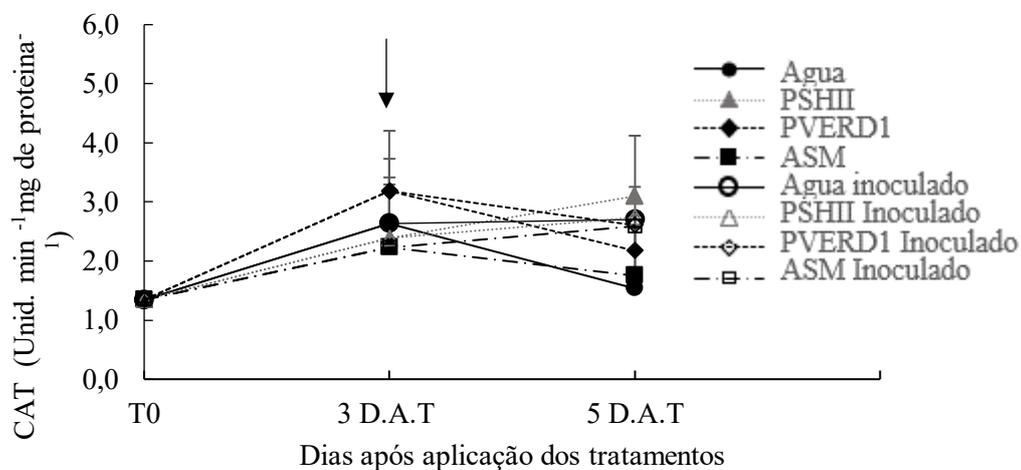


7.4.3. Catalase

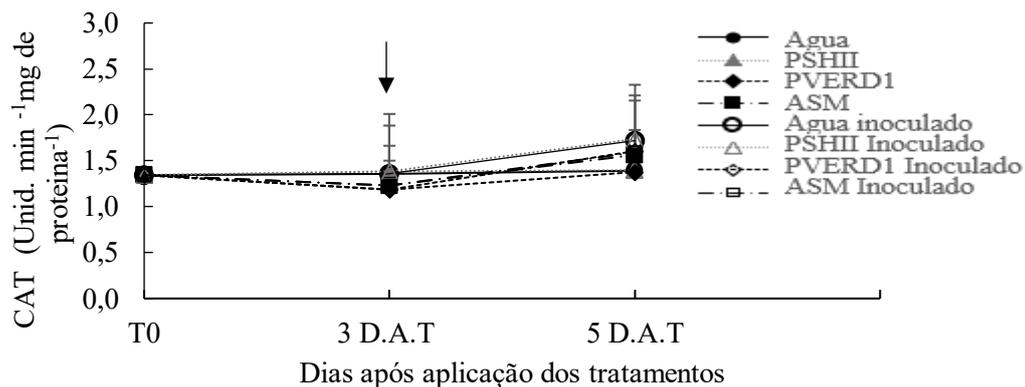
Não houve diferenças significativas na atividade de catalase nas folhas de morango do cv. San Andreas nos dois experimentos, independente dos produtos aplicados e da inoculação ou não com a *X. fragariae* (Figura 5 a e b).

Figura 5 - Atividade de catalase em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

(a)



(b)

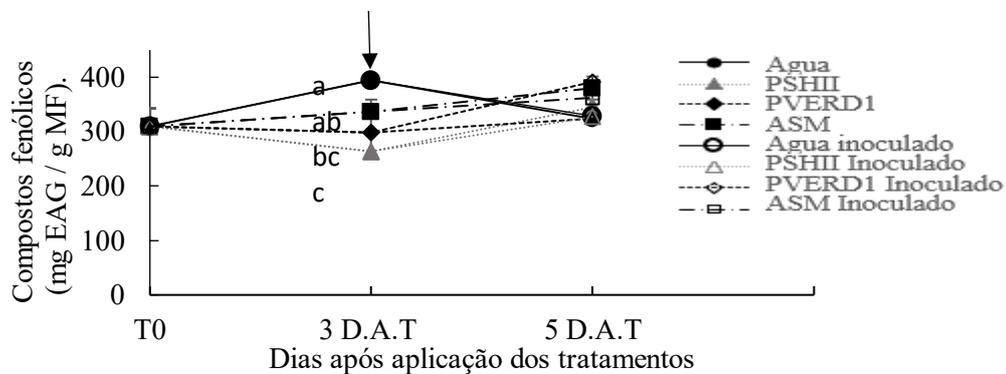


7.4.4. Compostos fenólicos

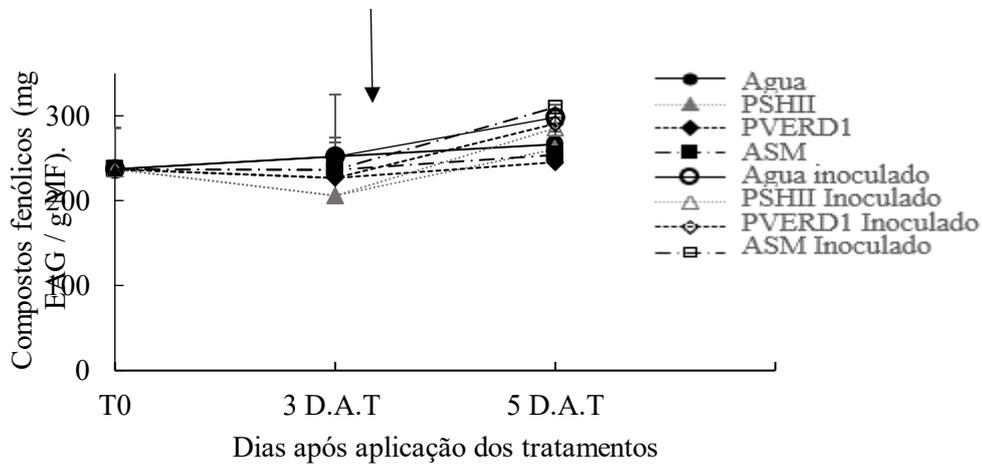
No primeiro experimento, observou-se que após 3 dias da pulverização dos tratamentos, as plantas que foram tratadas apresentaram menor teor de compostos fenólicos quando comparadas com a testemunha, o que não ocorreu aos 5 DAT (Figura 6 a). No segundo experimento, não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos, mesmo após a inoculação das plantas de morango com *X. fragariae* (Figura 6 b).

Figura 6 - Conteúdo de compostos fenólicos em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas, diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

(a)



(b)

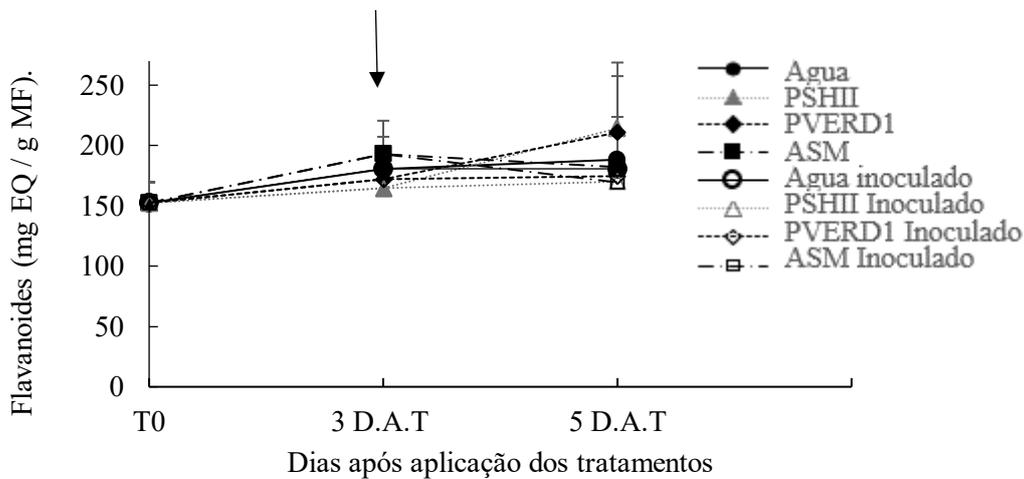


7.4.5. Flavonoides

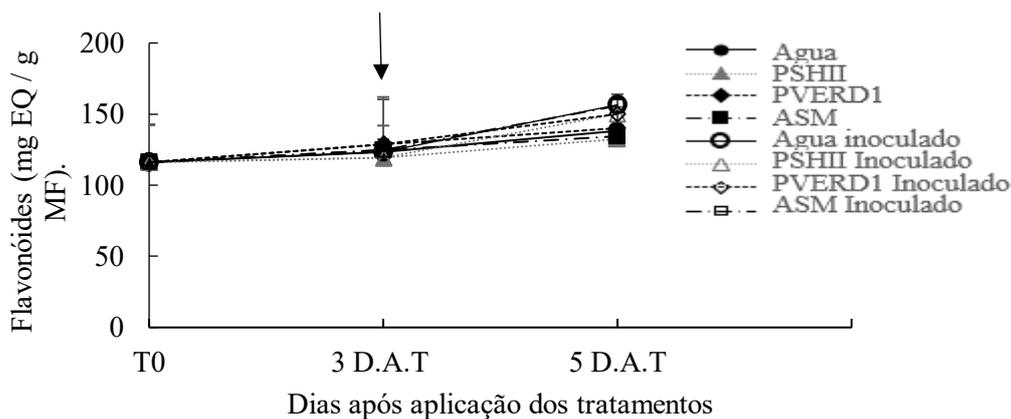
Não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos nos dois experimentos (a e b), mesmo após a inoculação das plantas de morango com *X. fragariae* (FIGURA 7).

Figura 7 - Conteúdo de flavonoides em plantas de morango do cultivar San Andreas tratadas com água destilada (●), extrato hidroalcoólico de própolis – PVERD1 a 5 mg/mL (◆); polissacarídeos extraídos do shiitake – PSHII a 3 mg/mL (Δ) ou ASM a 25 ppm (■), em dois experimentos distintos. A seta indica o momento da inoculação com *X. fragariae* (a uma concentração de 10^8 UFC/mL). Barras de erros indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

(a)



(b)



8. DISCUSSÃO

A mancha angular é a principal bacteriose do morangueiro e, se não controlada, pode acarretar em grandes perdas na produção da cultura. Diante disso, o controle da doença é feito basicamente de forma preventiva, evitando a entrada de mudas contaminadas no campo e com o uso de produtos à base de cobre. Nesse sentido, o estudo de métodos alternativos que sejam menos nocivos ao meio ambiente e ao ser humano torna-se necessário para obtenção de novas

ferramentas para o controle dessa doença.

A própolis e *Lentinula edodes* (cogumelo shiitake) apresentam propriedades medicinais interessantes relatadas na literatura. Apesar da própolis ser permitida na agricultura orgânica, pouco se sabe sobre o seu efeito no controle de doenças, principalmente as do morangueiro. Em relação ao shiitake, há uma grande produção residual de cogumelos irregulares e deformados, que geralmente são inutilizados e que poderiam ser aproveitados para a extração de subprodutos, como o caso de polissacarídeo (AGUIAR et al., 2016). Assim, o uso de extratos de polissacarídeos extraído da biomassa fúngica residual de *L. edodes* e de própolis podem se tornar uma ferramenta alternativa ao controle dessa doença.

Nos experimentos de proteção, o extrato de própolis PVERD1 reduziu significativamente a severidade da mancha angular provocada por *X. fragariae* em plantas da cultivar Albion, promovendo uma redução média de 72 %. Os outros três extratos de própolis avaliados (PVERD2, PVERM e PMARR) também reduziram a intensidade da doença, especialmente quando aplicados 3 dias antes da inoculação, mas o nível de proteção foi inferior ao promovido por PVERD1. Esses resultados corroboram com os encontrados por Pereira et al. (2008), onde a aplicação de extratos etanólicos de própolis controlou até 46% a incidência da cercosporiose.

No presente estudo, comparado ao PSHII e ao ASM, PVERD1 foi o único a exibir efeito direto *in vitro* sobre *X. fragariae* e também sobre a formação do biofilme bacteriano indicando que a proteção da doença provavelmente ocorreu devido ao efeito antimicrobiano da fonte de própolis. A formação do biofilme é uma estratégia dos microrganismos para sua sobrevivência em ambientes com condições adversas e torna-se importante nos processos de infecção, colonização e sobrevivência da bactéria na planta hospedeira. Biofilmes são agregados de células produzidos por bactérias que apresentam tendência de aderir às superfícies úmidas, multiplicar e embeber-se em uma matriz viscosa composta de substâncias exopolissacarídeas (HERRERA et al., 2007; CARPENTIER et al., 1993; SIMÕES et al., 2010). A formação do biofilme contribui para a virulência de muitas espécies de bactérias fitopatogênicas. Dentre elas, as *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* e *Xylella fastidiosa*. Algumas bactérias fitopatogênicas, (patógenos vasculares) após a infecção nas plantas, atingem os vasos condutores e produzem grandes quantidades de exopolissacarídeos formando o biofilme nos tecidos. Conseqüentemente, a obstrução desses vasos dificulta o transporte de água através

dos tecidos do xilema, causando sintomas de murcha (SCHUETZ et al., 2013; BAE et al., 2015).

Tendo em vista o exposto, a inibição da formação de biofilme de *X. fragariae* provavelmente ocorreu pela fonte de própolis apresentar substâncias antimicrobianas como por exemplo compostos fenólicos, o que conseqüentemente contribuiu para redução da severidade da mancha angular. LINGGRIANI et al. (2018) reforçam a hipótese que os flavonoides presentes nos extratos de própolis foram capazes de suprimir a formação de biofilme in vitro de *S. mutans* nas concentrações de 0,05 e 0,1%. Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, são substâncias com maior importância em termos de atividade biológica e estão presentes nos extratos de própolis. Os ácidos clorogênico, cafeico e gálico são exemplos desses compostos. Algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais livres, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos aos fitopatógenos (BARROS et al., 2010; HARTLEB et al., 1997). Dentre as fontes de própolis avaliadas, PVERD1 foi quem apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos, os quais podem ter atuado diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento e protegendo as plantas de morango. Na literatura, esses compostos são bem relatados como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (LO & NICHOLSON, 2008). Pesquisas sobre atividade biológica verificaram que as bactérias patogênicas humanas *Staphylococcus ssp*, *Escherichia coli* *Enterococcus spp*, *S. mutan*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *Actinomyces Naeslundii*, *Candida Albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram sensibilidade frente aos extratos de própolis (FERNANDES et al, 1997; PARK et al, 1998; PANZERI et al, 1999; ZÁRATE, 1999; PARK et al, 2000). Alguns estudos revelaram ainda que os extratos de própolis inibiram também o crescimento de bactérias fitopatogênicas *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis pv.phaseoli* (BIANCHINI & BEDENDO, 1998).

Além da hipótese que o PVERD1 poderia agir por antibiose, diretamente contra a bactéria, por exemplo inibindo a formação de biofilme bacteriano, sabe-se que mais de 300 compostos já foram identificados na própolis, alguns dos quais poderiam aumentar a resistência das folhas de morango por melhorar o aspecto nutricional da planta. Alguns nutrientes atuam como cofatores de várias enzimas-chave na biossíntese de metabólitos secundários da planta e podem atuar na síntese de fenóis e de lignina, enrijecendo os tecidos e aumentando a barreira física à entrada de patógenos (GRAHAM et al, 1991; MALAVOLTA et al. 1997).

Uma terceira hipótese para explicar a proteção exercida pela própolis em morango seria que algum dos compostos encontrados nos extratos poderia atuar como elicitador, ativando diretamente os mecanismos de defesa no morangueiro. Nesse estudo, PVERD1 promoveu aumentos nas atividades enzimáticas da FAL e SOD antes da inoculação com *X. fragariae*. São escassos os estudos realizados com a própolis como alternativa para induzir resistência em plantas. BALDIN et al. (2014) verificaram redução no crescimento bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, com maior efeito dos extratos de própolis utilizando a maior concentração de 5%. Esses extratos testados também induziram a síntese de faseolina em feijoeiros. Esse estudo reforça a hipótese levantada que PVERD1 poderia atuar como um elicitador nas plantas de morango.

Nessa pesquisa, a aplicação de PVERD1 não controlou a severidade da doença na cultivar San Andreas, sugerindo que as diferenças entre as temperaturas durante os experimentos e diferenças nas cultivares possam ter influenciado no estabelecimento da bactéria, no desenvolvimento da doença e conseqüentemente no nível de proteção conferido pelo agente antimicrobiano. Em experimentos realizados simultaneamente com as duas cultivares, Albion e San Andreas, LUIZ et al. (2017) observaram que a cv. Albion é mais susceptível a *X. fragariae* em relação à cv. San Andreas. Embora o maior controle da doença com a aplicação de PVERD1 foi observado na cultivar Albion em dois experimentos, a temperatura registrada nesse período pode ter influenciado no desenvolvimento da doença. Para o crescimento da *X. fragariae*, a temperatura ideal está entre 20 e 30°C.

Nessa faixa de temperatura, plantas da cv. San Andreas tratadas com água destilada exibiram 50 a 60% de severidade da mancha angular aos 22 dias após a inoculação (Tabelas 5 e 6), valores duas a três vezes maiores que a severidade nas plantas testemunhas da cultivar Albion, avaliadas 21 dias após a inoculação com a bactéria (Tabelas 3 e 4). Desse modo, o maior nível de proteção das plantas exercido por PVERD1 no experimento com a cultivar Albion (realizado no inverno) pode ter sido devido às temperaturas mais amenas registradas nesses experimentos, as quais desfavoreceram o crescimento e multiplicação da bactéria. Por outro lado, nos experimentos com a cultivar San Andreas, onde foram registradas temperaturas mais elevadas e mais propícias para o desenvolvimento da bacteriose, o nível de proteção conferido pelos produtos foi menor, incluindo a própolis.

A calda bordalesa (CAB) também exerceu um grau de controle sobre a bacteriose quando pulverizada aos 3 e 6 dias antes da inoculação da bactéria. Os resultados mostraram redução na severidade da mancha angular em cerca de 68% e 28%, respectivamente na

cultivar Albion. A proteção exercida pela calda bordalesa foi menor quando aplicada aos 6 dias antes da inoculação do patógeno, provavelmente devido à perda do efeito residual ao longo dos dias. Desta forma, a aplicação da CAB preventivamente foi mais eficiente no controle da mancha angular, quando aplicado 3 dias antes da inoculação. De acordo com BOCK et al. (1962), produtos à base de cobre quando aplicados em curto intervalo de tempo pode diminuir a severidade da ferrugem do café quando comparado aos maiores intervalos testados. PERUCH (2007) constatou que concentrações de 0,5% de calda bordalesa controlaram o míldio nas folhas da videira e diminuíram a incidência da doença nos cachos, porem em concentrações de 0,8% apresentaram fitotoxicidade nas plantas. No presente estudo, não foi observada fitotoxidez utilizando-se calda a 1% em plantas de morango.

Cogumelos como o shiitake apresentam moléculas que podem ativar os mecanismos de defesa nas plantas. A indução de resistência vegetal vem se mostrando um método alternativo para o controle de doenças em plantas. Nesse estudo, ao testar possíveis indutores de resistência nas cultivares de morango contra *X. fragariae* em casa-de-vegetação, a suspensão do polissacarídeo proveniente da biomassa fúngica de *L. edodes* (PSHII) reduziu significativamente a severidade da doença. Na cultivar Albion, observou-se uma maior redução na severidade da mancha angular quando a aplicação de PSHII ocorreu 6 dias antes da inoculação da bactéria, em relação a um intervalo de 3 dias, com níveis de controle de 47% e 30%, respectivamente. O intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência é extremamente importante para a eficácia do produto. Segundo VAN LOON et al. (1998), é necessário haver um intervalo mínimo entre o tratamento e a inoculação do patógeno para que a planta entre em estado de indução e para que expresse a resistência. Em geral, com plantas anuais, esse tempo é de aproximadamente uma semana.

Na cultivar San Andreas, PSHII reduziu a severidade da mancha angular em média de aproximadamente 30%. Esses resultados são similares aos encontrados por Aguiar et al. (2018) em plantas de tomate, onde reduções na severidade da mancha bacteriana em até 57% foram observadas após aplicação de PSHII. Além disso, essa aplicação de PSHII aumentou os níveis de peroxidases e o conteúdo de compostos fenólicos. SILVA et al. (2007) observaram aumento significativo na atividade de peroxidases em plantas de tomates previamente tratadas com extratos aquosos de *L. edodes*. DI PIERO et al. (2003), por sua vez, investigaram o potencial de *L. edodes* e *A. blazei* no controle de doenças em pepino, maracujá e tomate, verificando que estes cogumelos possuem substâncias elicitoras de respostas de defesa nas plantas, podendo assim auxiliar no controle de doenças. No presente estudo, a suspensão de

polissacarídeos de *L. edodes* também demonstrou potencial para controlar a mancha angular em morangueiros. Além disso, em função da ausência de ação direta de PSHIII sobre a bactéria *X. fragariae in vitro*, sugere-se que o polissacarídeo do shiitake controlou a doença possivelmente através da ativação dos mecanismos de defesa nos morangueiros. No entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar se PSHIII está agindo como um elicitor.

Outro produto testado foi o acibenzolar-S-metil (ASM), indutor sintético vegetal que após ser absorvido e translocado por toda a planta, pode ativar genes em resposta de defesa. No Brasil, registrado no MAPA como Bion®, o produto é indicado para o controle de algumas doenças. Dentre as bacterioses, destacam-se a mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*), pinta bacteriana (*Pseudomonas syringae pv. tomato*), canela-preta (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*), mancha angular (*Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum*). Nas plantas de morango aqui avaliadas, o indutor sintético ASM controlou significativamente a severidade da mancha angular em ambas as cultivares. Na cultivar Albion, observou-se maior redução na severidade da mancha angular (80%) quando o indutor foi aplicado aos 6 dias antes da inoculação com a bactéria. Frequentemente, a expressão da resistência induzida leva a uma redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo fitopatógeno, provocando um atraso no desenvolvimento da doença.

Na cultivar San Andreas, a aplicação do Acibenzolar-S-metil teve um menor nível de controle da doença, em média de 34%. Essa menor proteção das plantas contra o patógeno pode estar relacionada às temperaturas registradas no momento do experimento (início de verão) que estavam mais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. ASM também não apresentou efeito direto sobre a *X. fragariae*, indicando que a proteção das plantas provavelmente pode ter ocorrido devido a ativação dos mecanismos de defesa nos morangueiros.

O uso do Acibenzolar-S-metil vem mostrando resultados promissores no controle de doenças em plantas. MAZARO et al. (2008) mostraram reduções significativas na mancha-de-micosferela, na mancha-de-dendrofoma e flor preta com a pulverização de quitosana e ASM em comparação ao tratamento com fungicidas em morangueiros. Os mesmos autores observaram aumentos na atividade das β -1,3- glucanases e quitinases após a aplicação desses indutores. Em plantas de tomate, o acibenzolar-S-metil controlou a severidade da mancha bacteriana em aproximadamente 40%. Os autores também observaram aumento da atividade de peroxidases (POX) e polifenóis oxidases (PPO), enzimas ligadas à resistência induzida, relacionadas à lignificação como estratégia de defesa da planta (CAVALCANTE et al., 2006).

Corroborando com os resultados apresentados nessa pesquisa.

As plantas em resposta ao ataque de estressores bióticos, como patógenos, podem ativar seus mecanismos de defesa, causando alterações bioquímicas durante o processo de infecção. Os patógenos quando atacam as plantas fazem com que estas respondam de forma rápida com uma “explosão oxidativa”, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs, produzidas nas células vegetais, podem ser tóxicas às plantas e também aos patógenos. Diante disso, as plantas produzem enzimas antioxidantes que irão atuar sobre essas espécies. Como por exemplo, superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (FAL) (SERKEDJIEVA, 2011).

Ao se estudar um dos mecanismos de indução de resistência em morangueiros da cv. San Andreas, observou-se que PSHII e ASM promoveram um aumento da atividade de superóxido dismutase 3 dias após a aplicação. A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs e é responsável por catalisar a dismutação de um radical superóxido em peróxido de hidrogênio, podendo este ser tóxico ao patógeno (RESENDE et al., 2003; MAZARO, 2007). O H₂O₂ está ligado a várias linhas de defesa das células vegetais, pode atuar inibindo diretamente o crescimento do fitopatógeno, ou na produção de fitoalexinas, na expressão de genes de defesa, na morte celular em respostas de hipersensibilidade, no reforço da parede celular e conseqüentemente, na indução de resistência em plantas (LAMB e DIXON, 1997). A elevação na atividade da SOD nas plantas tratadas com PSHII ou ASM poderia contribuir para a redução observada na severidade da bacteriose. No entanto, a aplicação dos produtos não alterou a atividade de catalase, compostos fenólicos e flavonoides em morangueiros.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que PSHII e ASM possuem potencial no controle da mancha angular *X. fragariae*, pois exerceram controle sobre a doença em ambas as cultivares testadas, com destaque para o ASM. A fonte de própolis PVERD1 também reduziu a severidade da mancha angular e foi o único produto a exibir efeito antimicrobiano direto contra a bactéria.

O manejo da mancha angular deve enfatizar a utilização das diferentes estratégias de controle, considerando a infraestrutura e a mão-de-obra disponíveis para a obtenção de um resultado mais eficiente na produção. Uma possível sugestão de manejo para o controle da mancha angular de *Xanthomonas fragariae* seria a inclusão do extrato de própolis verde ou do shiitake dentro do manejo integrado desta doença, visto que possuem potencial no seu

controle. No entanto, mais estudos devem ser feitos para esclarecer a viabilidade dos produtos, concentrações e intervalos de aplicações, e se existem diferenças entre as cultivares. Além de avaliar outros mecanismos de defesa envolvidos no controle da mancha angular causada por *X. fragariae*.

9. CONCLUSÃO

O polissacarídeo do cogumelo shiitake PSHII e principalmente o indutor de resistência comercial ASM apresentam potencial para o controle da mancha angular do morangueiro provocada por *X. fragariae*, por terem reduzido a severidade da doença em duas cultivares, Albion e San Andreas. Por outro lado, os extratos de própolis apenas apresentaram efeito protetor na cultivar Albion, possivelmente pela ação antimicrobiana desse produto. Mais estudos devem ser realizados para avaliar se esses produtos estão ativando os mecanismos de resistência em morangueiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, Aislan Pereira Lira de. Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde. 2008.
- AGA, Hajime et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
- AGRIOS, G. N. Control of plant diseases. **Plant pathology**, v. 5, p. 295-357, 1997.
- AGROFIT: bases de dados. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. Acesso em <<http://agrofit.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.
- AGUIAR, T. **Frações polissacarídicas de fungos (*saccharomyces cerevisiae*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*) na indução de resistência em tomateiro (*solanum lycopersicon*) contra *Xanthomonas gardneri***. 2016. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- AGUIAR, T. et al. Residual polysaccharides from fungi reduce the bacterial spot in tomato plants. *Bragantia*, v. 77, n.2, p. 1–15, 2018.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ANTEROLA, Aldwin M.; LEWIS, Norman G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v. 61, n. 3, p. 221-294, 2002.
- ANTUNES, LEC; REISSER JUNIOR>, C; SCHWENGBER, JE (org). *Morangueiro*. Brasília: Embrapa, p.589, 2016.
- BAE, C. et al. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor Appl Genet*, v; 128, n. 7, p. 1219-1229, 2015.
- BALDIN, D.; SCARIOT, E.; TELAXKA, F. J.; JASKI, J. M.; FRANZENER, G.; MOURA, G. S.; GROSSELLI, M. A. Indução de faseolina em feijão e na atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pelo extrato etanólico de própolis. In: **I Congresso Paranaense de Agroecologia**, Pinhais - PR, 2014
- BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 190-193, 1999.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 3-4, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of Api Product and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 23-28, 2009.
- BANSKOTA, Arjun H.; TEZUKA, Yasuhiro; KADOTA, Shigetoshi. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

- BARROS, F.C., SAGATA, E., FERREIRA, L.C.C. and Juliatti, F.C. Indução de Resistência em Plantas contra Fitopatógenos. **Bioscience Journal**, 26, p. 231-239, 2010.
- BARROSO, G. M. et al. Frutos e sementes: morfologia aplicada a sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: RD. Da UFV, p. 443, 1999.
- BARTH, Monika Ortrud et al. Polen and Physicochemical analysis of Apis And Tetragonisca (Apidae) Honey. 2013.
- BORTOLOZZO, A. R.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MELO, G. W. B. de; KOVALESKI, A.; BERNARDI, J.; HOFFMANN, A.; BOTTON, M.; FREIRE, J. de M.; BRAGHINI, L. C.; VARGAS, L.; CALEGARIO, F. F.; FERLA, N. J.; PINENT, S. M. J. Produção de morangos no sistema semi-hidropônico. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 24 p. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular técnica**, 62).
- BASTOS, E.M.A.F 1998. Origem botânica e indicadores de qualidade da "própolis verde" produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil. (Tese - Doutorado). Ribeirão Preto: USP/FFCL, p. 137, 2001.
- BAUTISTA-BAÑOS, SILVIA et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 108-118, 2006.
- BAYSAL, O.; 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.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.
- BOLWELL, G. Paul et al. Modulation of the elicitation response in cultured French bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 397-405, 1991.
- BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., v. 72, p. 248, 1976.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. **Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry**. Journal of Applied Bacteriology, v. 75, p. 499-511, 1993.
- CALVETE, E. O. et al. Cultivo de morangueiro em ambiente protegido. In: CHAVARIA, G.; SANTOS, H. P. dos. (Eds.). Fruticultura em ambiente protegido. Brasília, DF: **Embrapa Uva e Vinho**. p. 149-206. 2012.
- CAVALCANTI, Leonardo S.; RESENDE, Mário Lúcio V. Effect of time and dosage of acibenzolar-S-methyl applications in inducing resistance to Verticillium wilt in cocoa seedlings. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2005.
- CAZORLA, Francisco M. et al. 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.

- COCCO, C. et al. Development and fruit yield of strawberry plants as affected by crown diameter and plantlet growing period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.45, n.7, p.730-736, 2010.
- COSTA, H.; VENTURA, J. A. Doenças do morangueiro: Diagnóstico de Manejo. In: BALBINO, J. M. S. (Ed.). *Tecnologias para Produção, Colheita e Pós-colheita de Morangueiro*. 2. ed., Vitória: Incaper, p. 41-57, 2006.
- DALAGNOL, G. L.. Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação. 2010. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- DANNER, Moeses Andriago et al. 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.
- DI PIERO, R.M. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-Sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de Doutorado em Agronomia, ESALQ, área de concentração: **Fitopatologia, Universidade de São Paulo**, 157 p., 2003.
- DI PIERO, Robson Marcelo; GARDA, Marcos Venicius. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.
- DINIZ, Lylian P. et al. Quantification of the efficacy of alternative products for tomato late blight control. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 171-179, 2006.
- FALCÓN, A. et al. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.103–112, 2008.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado em: 11/08/2016.
- FERNANDES JR, LOPES CAM, SFORCIN JM, FUNARI SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins* p. 287-94, 1997.
- FRANZENER, Gilmar et al. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.
- FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N. RELLA, M. G., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., MÉTRAUX, J.P., KESSMANN, H. & RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal** 10: p. 61-70, 1996.
- GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). *Micronutrients in Agriculture*. **Soil Science Society of America**, Madison, p.333–339, 1991.
- GAMBACORTA, G. et al. Pesticide residues in tomato grown in open field. **Food control**, v. 16, n. 7, p. 629-632, 2005.

- GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154-161, 2012.
- GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GOLAN, K.; RUBINOWSKA, K.; GÓRSKA-DRABIK, E. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (SW.) Schott. to *Coccus hesperidum* L. infestation. *Acta Biologica Cracoviensia*, v. 55, p. 93-98, 2013.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GOMES P. *Fruticultura brasileira*. 2007. 13.ed. São Paulo: Nobel
- GREENAWAY, W. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 46, n. 1-2, p. 111-121, 1991.
- HACISALIHOGU, GOKHAN et al. 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.
- HAHN M.G., ALBERSHEIM P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, v.62, n.1, p.107-111, 1978.
- HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Boca Raton: **CRC-Lewis Publishers**, p. 177-199, 1997.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 77-84, 1999.
- HAMMOND-KOSACK, Kim; JONES, Jonathan DG. Responses to plant pathogens. **Biochemistry and molecular biology of plants**, p. 1102-1156, 2000.
- HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. Resistance of crop plants against fungi. Stuttgart: G. Fischer, p. 544, 1997.
- HARBORNE, Jeffrey B. Flavonoids. In: **Natural products of woody plants**. Springer Berlin Heidelberg, p. 533-570, 1989.
- HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. aureus under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 585- 591, 2007.
- HIJWEGNWN, T., VERHAAR, M.A., ZADOKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6- dichloro iso nicotinic acid. **Plant Pathology** 45:632-635. 1996.
- HILDEBRAND, D. C., M. N. SCHROTH, S. WILHELM: Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. — **Phytopathology** 57, 1260–1261, 1967.

- HOFFMANN, A.; BERNARDI, J.. Produção de Morangos no Sistema Semi Hidropônico: Introdução. **Embrapa Uva e Vinho**. 2006.
- INOUE, H. Tiemi et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2007.
- ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Atividade antibacteriana de *Lentinula edodes* cultivado em meio líquido. **Brazilian J. Microbiology**, 32: p. 206-210, 2001
- KENNEDY, B. W. et al. Angular leafspot of Strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. **Phytopathology**, v. 52, n. 9, p. 873-875, 1962.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.
- LAMB C, DIXON RA The oxidative burst in plant disease resistance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 48: 251–275, 1997.
- LATTANZIO, Vincenzo; LATTANZIO, Veronica MT; CARDINALI, Angela. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, v. 661, p. 23-67, 2006.
- LAZAREVIC, V. SOLDI, B.; MÉDICO, N.; POOLEY, H.; BRON, S.; KARAMATA, D. *Bacillus subtilis* α -Phosphoglucosyltransferase Is Required for Normal Cell Morphology and Biofilm Formation. **Applied And Environmental Microbiology**. V. 71, n. 1, p. 39-45, 2005.
- LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. **São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica**, p. 120, 2006.
- LINGGRIANI, A.; RIZAL, M. F.; FAUZIAH, E.; SUHARSINI, M. Differences in the effects of 0.05% and 0.1% propolis flavonoids on in vitro biofilm formation by *Streptococcus mutans* from children's dental plaque. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 2, p. 215 – 218, 2018.
- LUIZ, C. Efeito de polissacarídeos no controle da mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e da podridão negra da couve-flor (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). **(Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFSC)**, 2013.
- LUIZ, C. DI PIERO, R.M. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170–177, 2016.
- LUIZ C, ROCHA NETO AC, DI PIERO RM Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **J Plant Pathol** 97: p. 119–127, 2015.
- LUIZ, C., ROCHA NETO, A.C., FRANCO, P.O., DI PEIRO, R.M., 2017. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Trop. Plant Pathol.** 3, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s40858-017-0153-5>.

- LO, C.S.C.; NICHOLSON, R.L. Phenolic compounds and their importance in plant disease, In: LEITE, B. et al. Physiology, biochemistry, and molecular biology of plant-pathogen interactions. Sao Paulo: FEALQ, 2008. p. 285-303.
- MAAS, J. L., M. R. POOLER, G. J. GALLETTA: Bacterial angular leafspot disease of strawberry: present status and prospects for control. — **Adv. Strawberry Res.** 14, p. 18–24, 1995.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Potafós, p. 319, 1997.
- MARCUCCI, María Cristina et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.
- MARINI, D. et al. Comunicação científica efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 79, n. 2, p. 305-308, 2012.
- MAZARO, Sergio Miguel et al. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista brasileira de fruticultura**, v. 30, p. 185-190, 2008.
- MAZARO, Sergio Miguel. Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores. 2007.
- MAZZUCCHI, U., A. ALBERGHINA, A. DALLI: Occurrence of *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King in Italy. — **Phytopathol. Z.** 76, 367–370, 1973.
- MCCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 603–613, 2000.
- MENESES, Erick A.; DURANGO, Diego L.; GARCÍA, Carlos M. Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2011-2017, 2009.
- MICHELIN DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn** 15: 316-320. 2005.
- MOORE-LANDEKER, E. Fundamentals of the fungi. 2.ed. **Englewood Cliffs: Prentice-Hall.** v.8. p 578, 1982.
- MORENO, María I. NIEVA et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 109-114, 2000.
- NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 603-612, 2001.

ORDÓÑEZ, J.A. Ovos e produtos derivados. In: Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre: Artmed, v.2, p.269-275, 2005.

PACUMBABA, R.P.; BEYL, C.A. & PACUMBABA JUNIOR, R.O. Shiitake mycelial leachate supresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease** 83:20-23. 1999.

PALHA, M. G. A planta do morangueiro. In Manual do morangueiro. Eds. **Maria Graça Palha**, INIAP/EAN. p. 3-12, 2005

PANAGOPOULOS, C. G., P. G. PSALLIDAS, A. S. ALIVIZATOS: A bacterial leafspot of strawberry in Greece caused by *Xanthomonas fragariae*. — **Phytopathol. Z.** 91, 33–38, 1978.

PANZERI, H; PEDRAZZI, V, OGASAWARA, M.S; ITO, I.Y; LARA, E.H.G; GABARRA, F.R. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliação física, microbiológica e clínica. **Rev. ABO Nac.** 7 (1): p. 26-30, 1999.

PARADA R.Y., MURAKAMI S., SHIMOMURA N., EGUSA M., OTANI H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Phytopathology**, v.160, p.390-396, 2012.

PARK, Y.K; IKEGAKI, M; ABREU, J.A.S; ALCICI, N.M.F. Estudo das preparações dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** p. 18, 1998.

PARK, Yong Kun et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Yong Kun; IKEGAKI, Masaharu et al. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybe Science, Tamagawa**, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

PASCHOLATI, S. F. et al. Hospedeiro: mecanismos de resistência. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 3, p. 417-453, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v. 29, n. 1, p. 115-116, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p.1 - 51, 1994.

PASCHOLATI, Sérgio Florentino; STANGARLIN, José Renato; PICCININ, Everaldo. **Cogumelos: Cultivo e comercializacão (Shiitake e cogumelo do sol)**. SEBRAE/MT, 1998.

PAULA, D. P.; TARSITANO, M. A. A.; GRACIOLLI, L. A. Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. **Scientia Agricola, Piracicaba-SP**, 58:p. 431-436, 2001.

PAULERT R., TALAMINI V., CASSOLATO J.E.F., DUARTE M.E.R., NOSEDA M.D., SMANIA JUNIOR A., STADNIK M.J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata*, on anthracnose severity and growth of common

- bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, v.116, n.6, p.263-270, 2009.
- PAULUS, Albert O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, v. 25, n. 8, p. 885-889, 1990.
- PEREIRA CS, GUIMARÃES RJ, POZZA EA & SILVA AA. Extrato etanólico de própolis (EEP) no controle de cercospora e ferrugem do cafeeiro. **Revista Ceres**, 55: p. 369-376, 2008.
- PERUCH, L.A.M.; MEDEIROS, A.M.; BRUNA, E.D; STADINIK, M. Biomassa cítrica, extrato de algas, calda bordalesa e fosfitos no controle do míldio da videira, cv. Niágara Branca. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.6, p.143-148, 2007.
- PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation. **Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa**. p. 217, 1988.
- RANI, P. U.; PRATYUSHA, S. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. *Journal of Asia Pacific Entomology*, v. 16, p. 131-136, 2013.
- REICHERT LJ; MADAIL JCM. Aspectos socioeconômicos. In: SANTOS AM; MEDEIROS ARM (eds). *Morango: produção*. Embrapa Clima Temperado (Pelotas). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 12-15. (Frutas do Brasil, 40). 2003.
- REIS, A.; COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. Brasília, Dezembro, 2011, 9 p. (**Circular Técnica 96**).
- RESENDE, M.L.V., NOJOSA, G.B.A., AGUILAR, M.A.G., SILVA, L.H.C.P., NIELLA, G.R., CARVALHO, G.A., GIOVANINI, G.R. & CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis perniciosus* através do benzotriazol (BTH). **Fitopatologia Brasileira** 25:149-156. 2000.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p. 123-130, 2003.
- RESENDE, Mário Lúcio V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 32, n. 3, p. 213-221, 2007.
- RIDE, J. P. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 187-192. 1980.
- SALATINO, Antonio et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SALES, Rui et al. Eficiência de acibenzolar-s-methyl e oxicloreto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citricola*, agente causal da "mancha-aquosa" no meloeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 1, p. 66-70, 2007.
- SANTOS, AM dos; SANTOS, A. M.; MEDEIROS, ARM. Cultivares. **Morango; produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 24-30, 2003.

- SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: **Science Publishers**, Chap.13, p. 275-293, 2011.
- SCHENK, Gerhard et al. Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes. **Gene**, v. 255, n. 2, p. 419-424, 2000.
- SCHUETZ, M.; SMITH, R.; ELLIS, B. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 11–31, 2013.
- SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 243-249, 2000.
- SHERWOOD, R. T. et al. Resistance to fungal penetration in Gramineae. **Phytopathology**, v. 70, n. 4, p. 273-279, 1980.
- SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, v.28, n.236, p.7-13, 2007.
- SILVA, E. O.; BASTOS, M. S. R.; ALVES, R. E.; SOARES, N. F. F.; PUSCHMANN, R. Segurança microbiológica em frutas e hortaliças minimamente processadas. In: encontro nacional sobre processamento mínimo de frutas e hortaliças, 4.; simpósio ibero-americano de vegetais frescos cortados, 1., 2006, São Pedro, SP. **Anais**. Piracicaba: USP/ESALQ; CYTED, 2006.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. **A review of current and emergent biofilm control strategies**. *LWT – Food Science and Technology*, v. 43, p. 573-583, 2010.
- 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, p. 189-196, 2007.
- SILVA W. J. et al. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly (methyl methacrylate) resin surface. **Bras. Dent. J.**, v. 19, n.3, p.190- 196, 2008.
- SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*. V.299, p.152 -178, 1999.
- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist** 132:1-45. 1996.
- SPANOS, G.A., WROLSTAD, R.E. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage-A review. **J.Agric. Food Chem.**, 40: 1478-1487, 1990.
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.16-21, 1994.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, and JP. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.
- TAIZ, L.; ZIEGER, E.. Nutrição mineral. In: TAIZ, L.; ZIEGER, E.. Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, Cap. 5. 2013.

TOLEDO, V.A.A. Estudo comparativo de parametros biológicos e de produção de cera e geleia real em colonias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, carnicas, italianas e seus híbridos. 1997.

TRUSHEVA, Boryana et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT: A software plant disease severity assessment. In: 8 th International congress of plant pathology, Christchurch, New Zealand, p.105, 2003.

VANDER P, VARUM KM, DOMARD A, EDDINE EL, GUEDDARI N & MOERSCHBACHER BM. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology**, 118:1353-1359. 1998.

VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 36: p. 453-483, 1998.

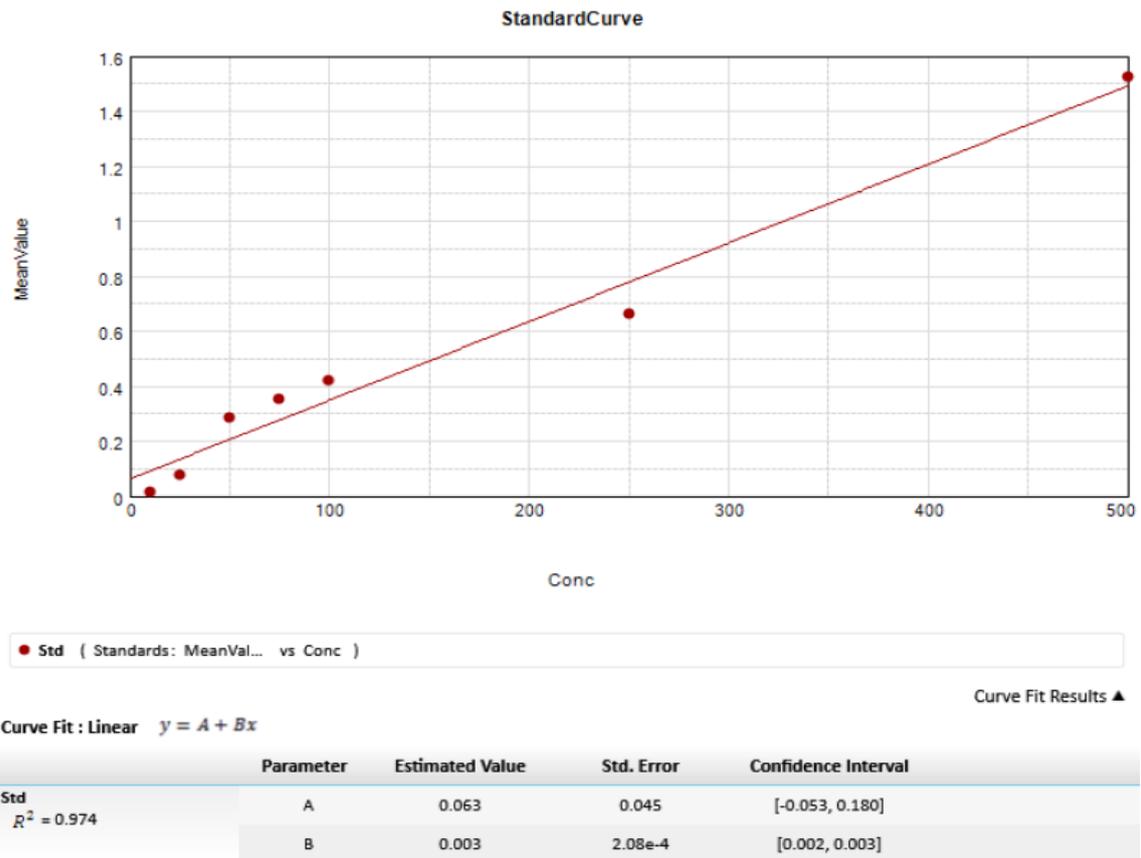
YANG, S. Z.; PENG, L. T.; SU, X. J. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 210-215, 2011.

ZÁRATE P.P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%, fluoreto de sódio a 0,2% e própolis 05% acrescida de fluoreto de sódio a 0,05% sobre níveis salivares de *Streptococcus* do grupo mutans em paciente cárie-ativos. (Tese de Doutorado); São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

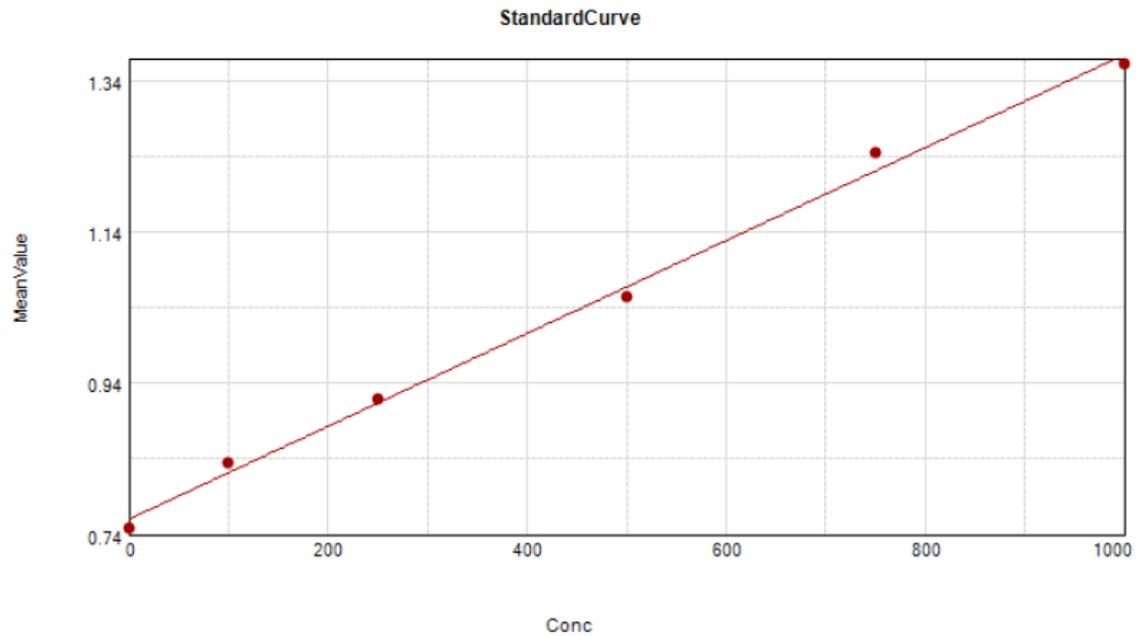
ZHAO, Jian; DAVIS, Lawrence C.; VERPOORTE, Robert. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Curva padrão para dosagem de fenilalanina amônia liase – No eixo x, ácido trans-cinâmico em $\mu\text{g/mL}$ e no eixo y, densidade ótica a 290 nm.



ANEXO B – Curva padrão para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford – No eixo x, BSA em $\mu\text{g/mL}$ e no eixo y, densidade ótica a 595 nm.



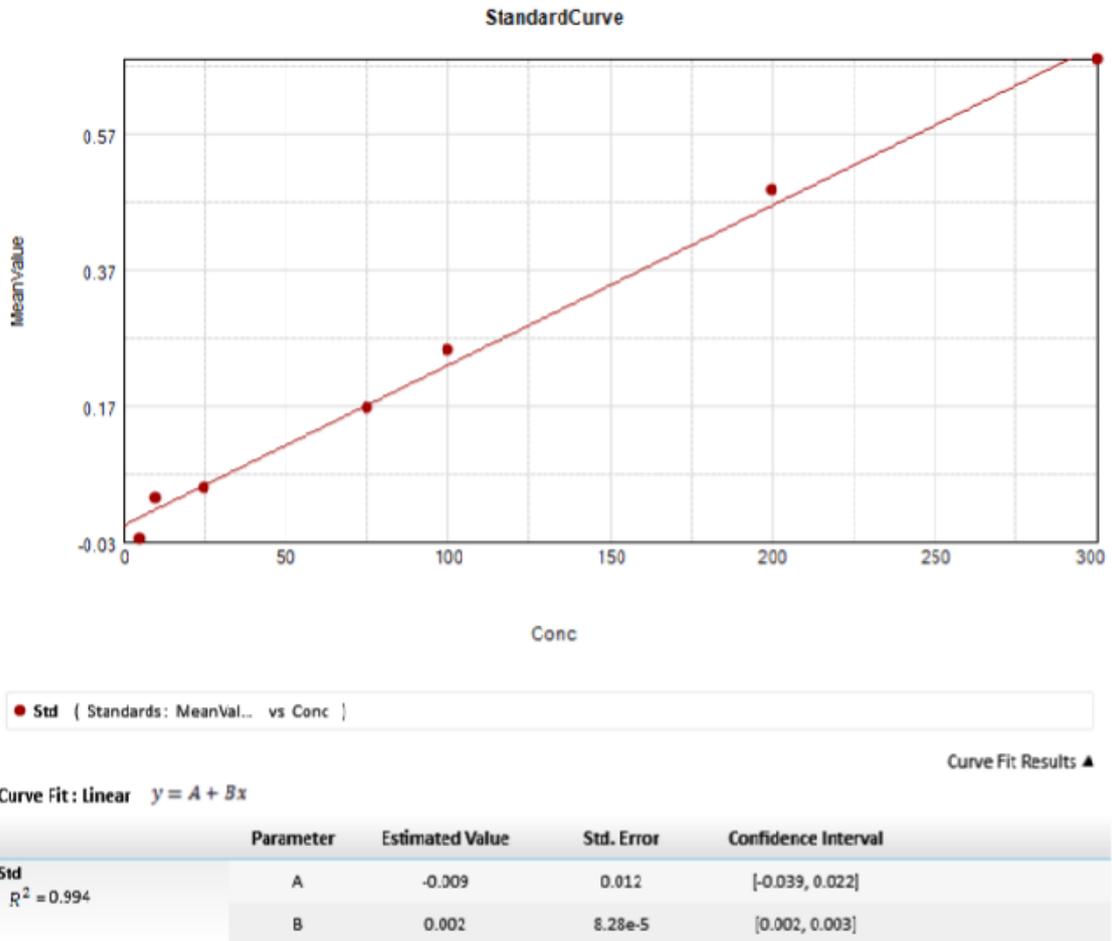
● Std (Standards: MeanVal... vs Conc)

Curve Fit Results ▲

Curve Fit : Linear $y = A + Bx$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
Std $R^2 = 0.996$	A	0.760	0.011	[0.729, 0.792]
	B	6.14e-4	2.02e-5	[5.58e-4, 6.71e-4]

ANEXO C – Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos – No eixo x, equivalente de ácido gálico em µg/mL e no eixo y, densidade ótica a 725 nm.



ANEXO D – Curva padrão para dosagem do conteúdo de flavonoides – No eixo x, equivalente de quercetina em $\mu\text{g/mL}$ e no eixo y, densidade ótica a 420 nm.

