

## EXTRATOS DE CANOLA NO CONTROLE DE *Botrytis cinerea* IN VITRO E EM PÓS-COLHEITA DE MORANGOS

Cláucia Cuzzi<sup>1</sup>; Idalmir dos Santos<sup>2</sup>; Andréia Vilani<sup>3</sup>; Etiane Tanise Sonogo<sup>4</sup>; Álvaro Rodrigo Freddo<sup>5\*</sup>; Sérgio Miguel Mazaro<sup>6</sup>

SAP 14276 Data envio: 01/06/2016 Data do aceite: 15/09/2016  
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 2, abr./jun., p. 179-185, 2017

**RESUMO** - Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de extratos de canola, obtidos por diferentes formas de extração (alcoólico, macerado, aquoso sem tempo de reserva e infusão), no controle *in vitro* e em pós-colheita de *Botrytis cinerea* em morangos cv. Camarosa. Em condição *in vitro* foram realizados dois experimentos, sendo crescimento micelial e germinação de conídios do fungo, em esquema fatorial 4 x 5, com os fatores modos de extração de extratos e concentrações (0%, 3%, 6%, 9% e 12%), em quatro repetições. Em pós-colheita foram testados os quatro tipos de extratos na concentração de 16%. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo a parcela composta por 10 frutos por bandeja. Foram avaliados parâmetros físico-químicos e análises bioquímicas. Os resultados demonstraram redução do crescimento micelial e da germinação de conídios, em função das concentrações, mas não ocorreram diferenças entre os extratos. A maior eficiência dos extratos ocorreu na concentração de 8,31%, na avaliação com 96 h. Os extratos alcoólicos, obtidos por maceração e infusão reduziram as podridões causadas por *B. cinerea* em pós-colheita de morangos. Os extratos atuaram na alteração do teor de acidez dos frutos e no comportamento das peroxidases, mas não apresentaram efeito sobre sólidos solúveis totais (SST), firmeza de polpa, perda de massa, antocianinas, flavonoides e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que os extratos de canola têm potencial para controle *in vitro* de *B. cinerea* e em pós-colheita de morangos.

**Palavras-chave:** *Brassica napus* L., controle alternativo, indução de resistência.

## CANOLA EXTRACTS FOR THE CONTROL OF *Botrytis cinerea* IN VITRO AND IN POST-HARVEST ON STRAWBERRIES

**ABSTRACT** - This study aimed to evaluate the effect of canola extracts obtained by different methods for extraction (alcohol, macerated, watery without reservation time and infusion), for the control of *Botrytis cinerea* *in vitro* and gray mold in post-harvest on strawberries cv. Camarosa. *In vitro* condition two experiments were conducted, being mycelial growth and conidia germination in a factorial 4 x 5, with factors extraction modes and extracts concentrations (0%, 3%, 6%, 9% and 12%), with four replicates. Post-harvest were tested four types of extracts at a concentration of 16%. The design was completely randomized, with four replicates per treatment, and the portion composed of 10 fruits per replicate. Physicochemical parameters and biochemical analyzes were evaluated. The results showed reduction of mycelial growth and conidia germination, depending on the concentrations, but there were no differences between the types of extracts. The higher efficiency of the extracts occurred at a concentration of 8.31%, the assessment within 96 hours. The alcoholic extracts, maceration and infusion reduced rots caused by *B. cinerea* in post-harvest strawberries. The extracts acted in changing the acidity of fruits and activity of peroxidases, but showed no effect on total soluble solids (TSS), hardness, weight loss, anthocyanins, flavonoids and the enzyme phenylalanine ammonia liase (PAL). The results of this study showed that the canola extracts has the potential to control *B. cinerea* *in vitro* and in post-harvest strawberries.

**Key words:** *Brassica napus* L., alternative control, resistance induction.

### INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da cultura do morangueiro é a alta incidência de doenças, nas diferentes

fases do ciclo. Dentre as doenças fúngicas dos frutos, destaca-se o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (EMBRAPA, 2008). O fungo *B. cinerea* é um

<sup>1</sup>Bióloga, Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, campus Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: [claucia\\_biologa@hotmail.com](mailto:claucia_biologa@hotmail.com)

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor, UTFPR. E-mail: [idalmir@utfpr.edu.br](mailto:idalmir@utfpr.edu.br)

<sup>3</sup>Bióloga, Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UTFPR. E-mail: [andreiavilani@yahoo.com.br](mailto:andreiavilani@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Médica Veterinária, Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UTFPR. E-mail: [etisonogo@yahoo.com](mailto:etisonogo@yahoo.com)

<sup>5</sup>Engenheiro Florestal, Dr., Professor, União de Ensino do Sudoeste do Paraná, UNISEP, campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: [alvaro.freddo@hotmail.com](mailto:alvaro.freddo@hotmail.com). \*Autor para correspondência

<sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor, UTFPR, campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: [sergio@utfpr.edu.br](mailto:sergio@utfpr.edu.br)

patógeno de grande importância e de difícil controle, já que possui um grande número de hospedeiros, ocorrência em ampla faixa geográfica e potencial de desenvolver epidemias rápidas e severas (MORANDI; MAFFIA, 2005). É um parasita facultativo, saprófita de matéria orgânica, que pode formar escleródios na ausência do hospedeiro (MAAS, 1998), correspondendo à fase anamórfica do ascomiceto *Botryotinia fukeliana* (De Bary) (TANAKA, 2002). Os danos por podridões em pós-colheita podem chegar a 40% em poucos dias, limitando a comercialização, principalmente para lugares mais distantes (BRACKMANN et al., 1999; BRACKMANN et al., 2001).

A aplicação intensiva de fungicidas resulta no surgimento de linhagens resistentes, além de provocar efeitos nocivos ao homem, tanto para os produtores quanto para os consumidores, animais e ao meio ambiente (SILVA et al., 2006). O morango está entre as quatro hortaliças mais contaminadas por agrotóxicos pela sua elevada utilização durante a produção (ANVISA, 2010).

Para reduzir o uso de produtos químicos no controle de doenças e obter frutos mais saudáveis, vários métodos alternativos vêm sendo testados em pós-colheita, como o biocontrole, atmosfera modificada, armazenamento refrigerado, indução de resistência e uso de extratos vegetais (GOUVEA et al., 2007; MAZARO et al., 2008). Além do potencial fungistático ou fungicida de extratos vegetais, a pesquisa tem avançado sobre o seu efeito na indução de resistência para o controle de fitopatógenos. As plantas ativam suas defesas através de elicitores, agentes bióticos ou abióticos, os quais podem ser de natureza orgânica, inorgânica ou sintética, atuando como indutores de resistência (STICHER et al., 1997).

A canola (*Brassica napus* L.), por pertencer à família Brassicaceae, possui metabólitos, como os isotiocianatos, classificados como biocidas. Resultados promissores, pelo uso dos extratos desta planta, foram observados no controle de fungos habitantes do solo (MOCCELIN, 2011), no controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea* Schlecht. ex Fr.) em pepineiro (*Cucumis sativus* L.) (PIVA, 2013) e no controle da podridão parda [*Monilinia fructicola* (G.Winter) Honey] na pós-colheita em pêssego [*Prunus persica* (L.) Batsch] (FLORES, 2013).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do uso de tipos e concentrações de extratos da canola no controle de *Botrytis cinerea in vitro* e do mofo cinzento em pós-colheita de morangos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização do experimento e preparo dos extratos

O trabalho foi conduzido no ano de 2011 no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, campus de Pato Branco, e no ano de 2012 no Laboratório de Fitossanidade da UTFPR, campus Dois Vizinhos. Para a realização dos experimentos em 2011 foram utilizadas plantas de canola “Hyola 60”, obtidas de lavouras da região de Pato Branco, no estágio de florescimento e nos experimentos de 2012, foram provenientes de Passo

Fundo, RS, da EMBRAPA Passo Fundo. Logo após a colheita, as plantas foram selecionadas, eliminando-se as partes doentes e danificadas. Em seguida, foram levadas para estufa de secagem a 45 °C até atingirem peso constante. Após, foram armazenadas em sacos plásticos na ausência de luz até sua utilização. Os extratos obtidos foram os seguintes: Extrato Alcoólico (EA), Infusão (I), Macerado (M) e Aquoso Sem Tempo de Reserva (ASTR).

O EA foi obtido pesando 80 g de material vegetal picado, adicionado a 420 mL de álcool de cereais em um becker de vidro e armazenado por 48 h na ausência de luz, à temperatura ambiente (25 °C). Após este período, o extrato vegetal, foi filtrado, obtendo-se um total de 380 mL. Na sequência, foi removido o etanol presente na solução por meio do evaporador rotativo por 1 h e 30 min à temperatura de 60 °C. O restante do resíduo da evaporação (30 mL) foi dissolvido em água destilada (ADE) até completar o volume da solução de 380 mL.

O extrato I foi feito em um becker de vidro, onde foram adicionados 420 mL de ADE aquecida a 100 °C sobre 80 g de material vegetal desidratado picado. Em seguida, o becker foi fechado e armazenado por 20 min, na ausência de luz, à temperatura ambiente (25 °C). Após isso o extrato vegetal foi filtrado em dupla camada de gaze, obtendo-se 170 mL.

O extrato M foi feito triturando-se em liquidificador, em velocidade média, 80 g de material vegetal desidratado, com 420 mL de ADE fria. O extrato foi transferido para um becker, onde permaneceu em repouso por 8 h, na ausência de luz e à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, o extrato vegetal foi filtrado em dupla camada de gaze, obtendo-se 200 mL.

Já o extrato ASTR, foi obtido triturando-se em liquidificador, em velocidade média, 80 g de material vegetal desidratado, com 420 mL de ADE fria. Logo em seguida, o extrato vegetal foi filtrado em dupla camada de gaze, obtendo-se 350 mL. A concentração inicial dos extratos de canola obtidos pelos diferentes modos de extração foi de 16%. A partir desta concentração foram realizadas diluições com ADE, obtendo-se as demais concentrações de 3%; 6%; 9% e 12%.

### Preparo do inoculo

O fungo *B. cinerea* utilizado neste estudo, foi isolado de morangos que apresentavam sintomas característicos da doença, o mofo cinzento, previamente obtido de áreas de produção no município de Pato Branco, PR, sendo repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), até obtenção de cultura pura. As placas foram incubadas à temperatura de 24 °C e fotoperíodo de 12 h, em câmara de crescimento, até a realização dos experimentos.

### Experimentos *in vitro*

Foram realizados dois experimentos *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 X 5 [métodos de extração (EA, I, M e ASTR) x concentrações (0%; 3%; 6%; 9% ou 12%)], com quatro repetições cada. Na concentração zero utilizou-se ADE.

Para avaliação da ação dos extratos de canola sobre o crescimento micelial de *B. cinerea*, as repetições foram placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA, onde foi depositado no centro, um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo micélio do fungo *B. cinerea*, previamente crescido por 7 dias em placas de Petri contendo meio BDA. Em seguida, as placas foram abertas e com pipeta volumétrica foram adicionados 2 mL dos respectivos extratos de canola e suas concentrações, nas tampas das placas. Logo após, as placas foram fechadas de maneira invertida. Deste modo, não ocorreu contato entre os extratos e o patógeno. As placas foram incubadas à temperatura de 24 °C e fotoperíodo de 12 h, em câmara de crescimento. As mensurações do diâmetro do crescimento micelial foram realizadas com régua graduada, quando as placas do tratamento testemunha foram atingidas pelas hifas do fungo, que ocorreu 96 h após a implantação do experimento.

No segundo experimento *in vitro* avaliou-se o efeito dos extratos e suas concentrações, sobre a germinação de conídios de *B. cinerea*. As repetições foram tubos de ensaio com tamanho de 15 cm x 160 mm. Em cada tubo foi adicionado 20 mL dos respectivos extratos de canola e concentrações, citadas anteriormente e 1 mL de suspensão de  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>, que após ser diluída no extrato, passou a ter uma concentração de  $5 \times 10^3$  conídios mL<sup>-1</sup> do patógeno. Os tubos foram vedados com papel filme e incubados a temperatura de 24 °C com fotoperíodo de 12 h. As avaliações de germinação de conídios foram realizadas 9 h após a implantação do experimento.

Para avaliação da germinação foram pipetados 40 µL de cada tubo de ensaio sobre uma lâmina de microscopia e observados em microscópio óptico comum, na objetiva de 40 x. Foram avaliados 60 conídios por tubo de ensaio, sendo considerados germinados, os que emitiram tubo germinativo com tamanho maior ou igual a duas vezes o diâmetro original do conídio.

### Experimento em pós-colheita

O experimento em pós-colheita foi realizado em dois anos, 2011 e 2012, utilizando-se morangos cv. Camarosa, oriundos de uma propriedade rural orgânica do município de Novo Horizonte, SC. Após a colheita, os pseudofrutos foram selecionados de acordo com a maturidade, eliminando-se os danificados e retirando-se as suas sépalas, com o objetivo de reduzir a fonte de inóculo. Neste estudo testaram-se os quatro tipos de extratos (EA, I, M e ASTR), na concentração de 16%, mais a testemunha, onde para esta, utilizou-se água destilada.

Os morangos foram imersos nos extratos em beakers de vidro por 3 min e em seguida, foram colocados sobre papel toalha para absorver o excesso e secos à temperatura ambiente (25 °C). Seis horas após a aplicação dos tratamentos, procedeu-se a inoculação do patógeno, previamente crescido em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, pulverizando-se com uma suspensão aquosa calibrada para  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>, até o ponto de escorrimento. Na sequência, os morangos foram colocados individualmente sobre um suporte plástico cilíndrico de PVC, de 2 cm de diâmetro, 1 cm altura e, posteriormente,

acondicionados em bandejas plásticas fechadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo a parcela composta por 10 morangos por bandeja.

As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento, a uma temperatura de 24 °C e fotoperíodo de 12 h. As avaliações de incidência de podridões foram realizadas quando a primeira bandeja apresentou 50% dos pseudofrutos com sintomas típicos, cerca de dois dias após a implantação do experimento.

O experimento em pós-colheita foi avaliado com análises patométricas, físico-químicas e bioquímicas. As variáveis respostas patométricas foram realizadas ao final do experimento, como a incidência de podridões, expressa em porcentagem de morangos podres. Para as avaliações físico-químicas em pós-colheita de morangos, utilizaram-se os sadios remanescentes da avaliação anterior, sem incidência do mofo cinzento. Os parâmetros avaliados foram: perda de massa (PM), firmeza de polpa (FP), teor de sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT).

A PM foi avaliada por meio da pesagem dos frutos no início e final do experimento, obtendo a perda percentual em relação à primeira pesagem. A FP foi determinada com penetrômetro digital com ponteira de 8 mm de diâmetro, colocado em suporte metálico, avaliando-se nas faces opostas do morango, na sua região equatorial, sendo os valores expressos em libras. Os SST foram avaliados por meio da extração do suco dos frutos, determinando o resultado em °Brix, com refratômetro digital. Já a AT foi realizada extraíndo 10 mL de suco dos frutos, diluindo em 100 mL de ADE, seguido por titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N até atingir pH 8,1, sendo o resultado expresso em meq 100 mL<sup>-1</sup>.

As avaliações bioquímicas em pós-colheita de morangos foram realizadas a partir de tecidos sadios, coletados dos mesmos pseudofrutos utilizados para as análises físico-químicas. Após a coleta, o material foi armazenado em freezer a -20 °C, até as avaliações. As seguintes análises bioquímicas e metodologias foram utilizadas: proteínas totais (BRADFORD, 1976); flavonoides e antocianinas (LEES; FRANCIS, 1972); atividade enzimática de peroxidases (MATSUNO; URITANI, 1972) e a atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase (FAL) (HYODO et al., 1978; RODRIGUES et al., 2006).

Os dados de todas as variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância e quando significativos, os dados qualitativos foram submetidos ao teste Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Para os tratamentos quantitativos, onde houve efeito significativo, utilizou-se análise de regressão, determinando-se assim os modelos matemáticos para explicar o comportamento das variáveis como as concentrações dos extratos aplicados.

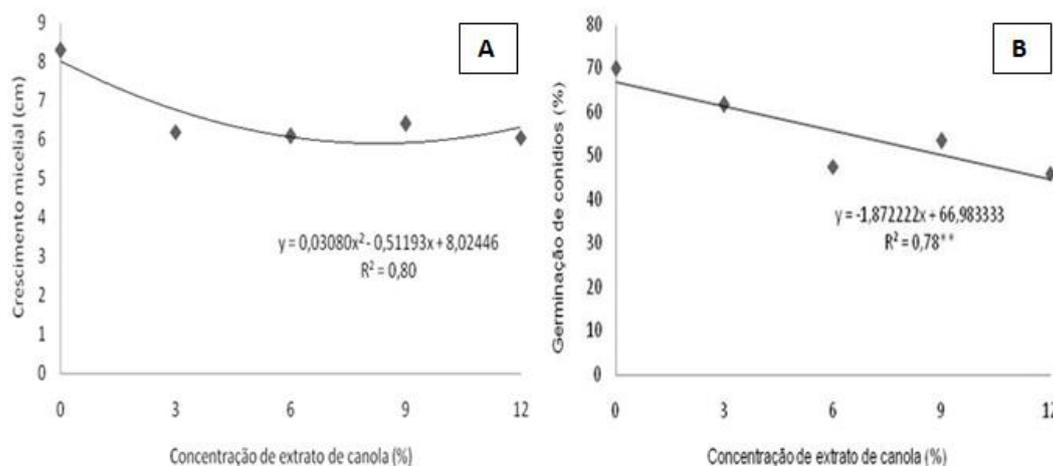
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimentos *in vitro*

Nestes experimentos não houve interação significativa entre os fatores estudados (métodos de extração x concentrações de extratos de canola), sobre o crescimento micelial e na germinação de conídios de *B.*

*cinerea*. Ao analisar os fatores isoladamente, observam-se apenas diferenças entre as concentrações dos extratos de

canola pré-estabelecidas, para as duas variáveis avaliadas nos experimentos *in vitro* (Figura 1).



**FIGURA 1** - Crescimento micelial (A) e germinação de conídios (B) de *Botrytis cinerea* em função de concentrações de extratos de canola, incubados por 96 h em meio de cultivo BDA, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (A) e em tubos de ensaio por 9 h a 25 °C (B).

Para o crescimento micelial, o comportamento da variável foi quadrática, tendo o ponto de máxima eficiência técnica obtido na concentração de 8,3%, com uma inibição de 34,4% sobre o crescimento micelial do patógeno (Figura 1). Enquanto que para a germinação de conídios, o comportamento foi linear decrescente, ou seja, com o aumento das concentrações dos extratos ocorreu diminuição da variável resposta (Figura 1). No tratamento realizado com extrato aquoso sem tempo de reserva (ASTR), não foi possível avaliar a germinação de conídios de *B. cinerea*, devido à presença de resíduos da canola no extrato, dificultando o reconhecimento dos conídios do fungo.

O efeito de extratos de plantas da família das brássicas, como *B. napus* e *Brassica juncea*, sobre o crescimento micelial, foi comprovado por Kirkegaard et al. (1996), ao testarem os extratos dessas duas espécies sobre *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora irregularis*. Os autores constataram que dentre as duas espécies de brássicas avaliadas, *B. juncea* foi mais supressiva na fase de maturação e floração do que a *B. napus*.

Moccelin (2011) ao testar o efeito de extratos de diferentes espécies de brássicas, repolho, canola e mostarda, sobre o crescimento micelial de *P. aphanidermathum*, *R. solani* e *Sclerotium rolfsii*, constatou que o pó da canola reduziu o crescimento micelial dos patógenos com o aumento das doses testadas. Em outro estudo, Freire et al. (2003), utilizando brássicas, observaram ação antifúngica de compostos voláteis liberados pelos resíduos de *B. juncea* e duas variedades de *B. napus*, contra o fungo *Fusarium oxysporum*, isolados 9321A, 9312F, 9051C e 9243G. Os autores também observaram que estas espécies vegetais apenas inibiram o crescimento micelial e germinação de conídios do isolado 9321A de *F. oxysporum*.

Flores (2013) testando extrato aquoso, alcoólico, maceração e infusão de canola, no controle *in vitro* e *in vivo* de *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey, agente

causador da podridão parda em pêssego, evidenciou que os extratos inibiram a germinação de conídios do patógeno e o crescimento micelial. O extrato de canola na concentração de 10% apresentou melhor resultado neste estudo, com 78% e 69% de controle em duas avaliações realizadas.

Pelos resultados obtidos neste estudo (Figura 1), possivelmente tal efeito fungistático também seja devido aos compostos voláteis presentes no extrato, como os glucosinolatos, que quando hidrolisados pela enzima mirosinase formam gases voláteis, a exemplo dos isotiocianatos, que podem apresentar efeito supressor no crescimento micelial de alguns patógenos. Tal hipótese é sugerida, pois os diferentes extratos de canola testados não tiveram contato direto com o patógeno, e mesmo assim, apresentaram efeito supressor no crescimento micelial de *B. cinerea*. Além disso, pressupõe-se que possam existir outros compostos responsáveis pelo controle, visto que, o extrato alcoólico (EA) foi rotaevaporado. Com isso, aumentou a possibilidade de volatilização dos compostos voláteis e mesmo assim reduziu significativamente o crescimento micelial e a germinação de conídios de *B. cinerea* (Figura 1).

#### Experimentos em pós-colheita

No ano de 2011, apenas os extratos EA e macerado (M) reduziram significativamente as podridões nos morangos, com um controle de 83,3% e 50%, respectivamente, em relação ao tratamento testemunha. No ano de 2012, ao repetir o experimento, confirmou-se o efeito significativo no controle das podridões. Além disso, neste estudo, o extrato por infusão (I), também reduziu as podridões, diferindo do tratamento testemunha (Tabela 1).

Os resultados obtidos nesses experimentos demonstram o potencial do uso de extratos de canola no controle de podridões em pós-colheita de morangos. Tais resultados corroboram com trabalhos de outros autores, como o de Mari et al. (2002), onde observaram um

controle satisfatório do mofo azul, causado por *Penicillium expansum*, após exposição de pêras, por um período de 24 h a temperatura ambiente, com atmosfera enriquecida com isotiocianato de alil, oriundo de farinha desengordurada de *B. juncea*. Estes autores, avaliando cinco diferentes tipos

de isotiocianatos sobre podridão parda em pêssego, observaram que o butenil e alil reduziram significativamente a doença em relação aos outros, isotiocianatos benzil, feniletil e metiltiobutil.

**TABELA 1.** Incidência de podridões em morangos cv. Camarosa, com e sem sépalas, em diferentes safras e avaliações físico-químicas, sob tratamentos com diferentes tipos de extratos obtidos de plantas de canola (*Brassica napus* L.).

Tipos de extratos	Incidência de Podridões (%)			FP (N)	AT (meq. 100 ml <sup>-1</sup> )	SST (°Brix)	PM (%)
	2011		2012				
	Com sépalas	Com sépalas	Sem sépalas				
Testemunha	60,0 a*	52,5 a	65,0 a	1,43 <sup>ns</sup>	13,9 a	4,7 <sup>ns</sup>	0,7 <sup>ns</sup>
EA	10,0 b	30,0 c	37,5 b	1,46	11,5 bc	4,4	0,4
ASTR	80,0 a	42,0 ab	65,0 a	1,35	10,6 c	4,4	0,6
I	90,0 a	45,0 ab	45,0 b	1,30	12,2 b	4,1	0,9
M	30,0 b	37,5 bc	27,5 b	1,60	10,5 c	4,2	0,4
CV (%)	29,25	34,78	39,71	26,18	8,83	14,5	46,83

Em que: EA: extrato aquoso; ASTR: aquoso sem tempo de reserva; I: infusão; M: macerado; FP: firmeza de polpa; AT: acidez titulável; SST: sólidos solúveis totais; PM: perda de massa.

\*Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; <sup>ns</sup>Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em outro trabalho, Flores (2013) avaliando vários extratos vegetais em suas diferentes formas de extração, aquosa, alcoólica, maceração e infusão, com intuito de controlar a podridão parda, causada por *Monilinia fructicola*, em pós-colheita de pêssegos, evidenciou que todos os tratamentos que foram submetidos ao controle com extrato de canola apresentaram lesões significativamente menores, quando comparados às suas respectivas testemunhas. O extrato de canola obtido por infusão se destacou em relação aos demais, com um melhor controle de podridões nos frutos.

Os testes em pós-colheita do presente estudo apresentaram diferenças significativas de controle entre os extratos obtidos por diferentes modos de extração, diferentemente dos testes *in vitro*. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato dos extratos terem contato direto com os pseudofrutos, o que não aconteceu nos experimentos *in vitro*. O contato direto com os pseudofrutos pode ter formado uma barreira que dificultou a penetração dos conídios do fungo nos tecidos do hospedeiro e conseqüentemente, retardou o processo infeccioso nos morangos. Além disso, pressupõe-se que possam existir quantidades diferenciadas de isotiocianatos, presentes nos extratos, em função da forma de extração. Também diferente dos testes *in vitro*, quando se aplicaram os extratos *in vivo* pode ter ocorrido a ativação de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRPs) e conseqüentemente, reduzido as podridões dos morangos (Tabela 1).

Os extratos de canola EA e M são mais indicados como alternativa de controle da doença em estudo, já que apresentaram resultados significativos nos três experimentos. Para o experimento de 2011, os extratos apresentaram controle de 83,3% e 50%, respectivamente. Já para os experimentos de 2012, apresentaram um

controle de 42,8% e 29,5%. O extrato obtido por I apresentou controle apenas em um dos experimentos e com um potencial baixo de controle (25%), não sendo indicado como alternativa de controle do mofo cinzento em pós-colheita de morangos.

Possivelmente os teores de glucosinolatos das plantas de canola utilizadas nos experimentos de 2011 e 2012 eram diferentes, já que as plantas não foram submetidas às mesmas condições ambientais durante o seu desenvolvimento, tendo em vista que as plantas utilizadas no ano de 2011 eram da região sudoeste do Paraná, enquanto as do ano de 2012 eram provenientes do Rio Grande do Sul. Tendo em vista que a região do Rio Grande do Sul possui temperaturas médias mais baixas em relação ao sudoeste do Paraná, possivelmente propiciam uma maior concentração de metabólitos secundários, neste caso, os glucosinolatos, entretanto, são necessários maiores estudos para comprovar esta hipótese, inclusive utilizando análises cromatográficas das plantas em cada região.

Em relação às variáveis físico-químicas avaliadas nesse trabalho, em 2012, observou-se que os extratos de canola não apresentaram diferença estatística em relação à FP, SST e PM (Tabela 1). A não alteração da FP demonstra que os extratos não apresentam ação direta sobre a degradação das paredes celulares e a turgidez dos tecidos. Esta é uma variável muito importante em frutos, pois durante a maturação ocorre um incremento de enzimas, principalmente a poligalacturonase, a pectinase e a celulase, degradando os principais constituintes da parede celular, como a transformação de protopectinas em pectinas solúveis (MAZARO et al., 2008).

No entanto, ao analisar os diferentes modos de extração de canola, observou-se que todos os extratos reduziram a AT, quando comparado ao tratamento

testemunha (Tabela 1). Possivelmente, tal fato ocorreu porque os extratos de canola interferiram no metabolismo primário dos frutos, desencadeando uma maior degradação dos ácidos orgânicos. O teor de acidez é um fator importante para determinar o sabor e aroma de um alimento. Em morangos, ácidos orgânicos como cítrico e málico, servem de substrato nos processos respiratórios pelo ciclo de Krebs, o que reduz a acidez dos pseudofrutos durante a maturação (MAZARO, 2007).

Quanto aos SSTs, novamente observou-se que os valores não diferiram estatisticamente em relação ao tratamento testemunha. SSTs são substâncias dissolvidas por um solvente, sendo que quando se trata de alimentos, esse solvente é a água, formados principalmente por

açúcares, cuja maturação dos frutos tendencia o aumento dos mesmos (CHITARRA; CHITARRA, 2006), devido à degradação ou biossíntese de polissacarídeos (MANGNABOSCO et al., 2008).

#### Análises bioquímicas

Nos resultados obtidos em 2011, não houve diferença nos parâmetros proteínas, FAL, antocianinas e flavonoides, quando comparados ao tratamento testemunha (Tabela 2). Já as peroxidases foram ativadas pelo extrato de canola obtido por I, no entanto, este não diferiu de M e ASTR. Nos dados obtidos no ano de 2012, não se observaram diferenças estatísticas para nenhuma das variáveis bioquímicas avaliadas (Tabela 2).

**TABELA 2.** Análises bioquímicas de tecidos de morangos cv. Camarosa, tratados com diferentes tipos de extratos obtidos de plantas de canola (*Brassica napus* L.), nas safras 2011 e 2012.

Tipos de extratos	Proteínas (mg. g <sup>-1</sup> tecido)		Peroxidases (ud enzimática. min <sup>-1</sup> )		Fenilalanina amônia-liase (FAL) (UAbs min. mg <sup>-1</sup> proteína)		Antocianinas (mg.100 g <sup>-1</sup> )		Flavonoides (mg.100 g <sup>-1</sup> )	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Testemunha	1,8 <sup>ns</sup>	1,3 <sup>ns</sup>	6,7 b*	1,2 <sup>ns</sup>	0,013 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	88,8 <sup>ns</sup>	7,1 <sup>ns</sup>	79,3 <sup>ns</sup>	1,4 <sup>ns</sup>
EA	2,1	1,2	6,9 b	1,1	0,010	0,004	128,0	5,9	103,1	1,3
ASTR	2,0	1,1	8,1 ab	0,9	0,009	0,004	91,5	7,3	93,3	1,5
I	2,3	1,3	11,2 a	1,1	0,010	0,002	137,1	8,4	120,6	1,7
M	1,9	1,5	7,7 ab	1,2	0,009	0,002	118,9	5,8	115,2	1,2
CV (%)	19,75	33,85	22,00	39,55	40,92	53,3	27,32	21,67	22,93	20,28

Em que: EA: extrato aquoso; ASTR: aquoso sem tempo de reserva; I: infusão; M: macerado.

\*Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; <sup>ns</sup>não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

As peroxidases que pertencem a um grupo de glicoproteínas não possuem ação direta na Resistência Sistêmica Adquirida (RSA). No entanto, sua alteração indica alteração no metabolismo da planta, pois atua na catalização da produção de lignina, destruição peroxidativa de reguladores de crescimento, além de atuarem sobre as espécies ativas aos oxigênios (EAOs), livrando a célula de seu efeito deletério (LABANCA, 2002). Além disso, incorporam glicoproteínas à parede celular, catalizam a formação de lignina, as quais podem formar barreiras mecânicas ao crescimento do patógeno, desta forma ocorre maior resistência da parede celular contra a ação de enzimas hidrolíticas, dificultando ao patógeno a utilização dos nutrientes do hospedeiro (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Tais resultados estão de acordo com trabalho desenvolvido por Mangnabosco (2010), em que o autor demonstrou a ação da calda bordalesa sobre a atividade das peroxidases em cultivo orgânico de morangos. Este produto alterou a atividade da enzima, sendo que com o aumento das concentrações desse, ocorreu aumento de sua atividade.

Possivelmente os extratos de canola obtidos por diferentes modos de extração, quando aplicados em pós-colheita de morangos, não ativam a atividade da FAL, pois

provavelmente, a forma de defesa vegetal não tenha sido pela ativação da rota dos fenilpropanóides, o que consequentemente também não alterou compostos fenólicos como as antocianinas e flavonoides.

#### CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições que este trabalho foi desenvolvido, pode-se concluir que extratos de canola obtidos por extração alcoólica, infusão, maceração e aquoso sem tempo de reserva, reduzem o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *B. cinerea*, sendo diretamente proporcional com o aumento da sua dosagem.

Os extratos alcoólicos, por maceração e infusão reduzem a podridão causada por *B. cinerea* em pós-colheita de morangos, bem como a acidez resultante do seu processo, o que pode ser explicado principalmente pelo efeito fungistático e fungicida direto observado no trabalho *in vitro*. A ativação de mecanismos de defesa não foi evidenciada no trabalho, pois houve aumento da atividade enzimática somente de peroxidases e apenas em uma safra na qual foi feito o presente experimento.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Minuta de Nota Técnica para divulgação de relatório de atividades de 2009. Brasília: ANVISA, 2010.
- BRACKMANN, A.; HUNSCH, M.; BALEM, T.A. Efeito de filmes de PVC esticável e polietileno no acúmulo de CO<sub>2</sub> e na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos cv. Tangi. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.2, p.89-92, 1999.
- BRACKMANN, A.; HUNSCH, M.; WACLAWOVSKI, A.J.; DONAZZOLO, J. Armazenamento de morangos cv. Oso Grande (*Fragaria ananassa* L.) sob elevadas pressões parciais de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.1, p.10-14, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CHITARRA, M.L.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças**: glossário. Lavras: UFLA, 2006. 256p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Incidência de doenças de pós-colheita em frutos de morango produzidos no Distrito Federal**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 13p.
- FLORES, M.F. **Extratos vegetais no controle de podridão parda (*Monilinia fructicola*) em pêssego**. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.
- FREIRE, M.F.I.; MATTHEW, J.M.; GUY, R.K. Atividade antifúngica de substâncias voláteis presentes em *Brassica napus* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.84, n.3, p.97-99, 2003.
- GOUVEA, A.; KUHN, O.J.; MAZARO, S.M.; MIO, L.L.M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; FONSECA, V.C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.527-533, 2009.
- HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v.62, n.1, p.31-35, 1978.
- KIRKEGAARD, J.A.; WONG, P.J.W.; DESMARCHÉLIER, J.M. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassicas* tissues. **Plant Pathology**, v.45, p.593-603, 1996.
- LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 107p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, n.1, p.83-84, 1972.
- MAAS, J.L. **Compendium of strawberry diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1998. 98p.
- MANGNABOSCO, M.C.; GODOY, W.I.; MAZARO, S.M.; CITADIN, I.; FARINACIO, D.; BORSATTI, F.; BORSATTI, F. Avaliação das características químicas de seis cultivares de morangueiro na região Sudoeste do Paraná. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.5456-5461, 2008.
- MARI, M.; LEONI, O.; IORI, R.; CEMBALI, T. Antifungal vapour-phase of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, v.51, p.231-236, 2002.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, v.23, p.1091-1101, 1972.
- MAZARO, S.M. **Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. 2007. 87p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; DE MIO, L.L.M.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-smetil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.185-190, 2008.
- MOCCELLIN, R. **Espécies de brássicas no controle de fitopatógenos habitantes do solo**. 2011. 63p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.
- MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A. **Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 37p.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.2, p.1-51, 1994.
- PIVA, C.A.G. **Extratos de canola e própolis no controle de oídio em pepineiro**. 2013. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.
- RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA, N.E.; COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, p.492-499, 2006.
- SILVA, M.B.; ROSA, M.B.; BRASILEIRO, B.G.; SILVA, C.A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; TRAZILBO, J.P.J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. 1. ed. Viçosa: EPAMIG, 2006. p.221-246.
- STICHER, L.; MAUCH, M.B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.
- TANAKA, M.; PASSOS, F.A.; BETTI, J.A. Resistência de *Colletotrichum fragariae* e *C. acutatum* ao benomyl na cultura do morango no Estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, v.54, p.139-146, 1997.