



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE AGRONOMIA

EDUARDA MAIA PASSAGLIA

**TRATAMENTO BIÓTICO E ABIÓTICO EM SEMENTES DE COUVE DE
BRUXELAS PARA O CONTROLE DE SCLEROTÍNIA E INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA**

ERECHIM

2022

EDUARDA MAIA PASSAGLIA

**TRATAMENTO BIÓTICO E ABIÓTICO EM SEMENTES DE COUVE DE
BRUXELAS PARA O CONTROLE DE SCLEROTINIA E INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Paola Mendes Milanesi

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Eduarda Maia Passaglia
TRATAMENTO BIÓTICO E ABIÓTICO EM SEMENTES DE COUVE DE
BRUXELAS PARA O CONTROLE DE SCLEROTINIA E INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA / Eduarda Maia Passaglia . -- 2022.
29 f.

Orientadora: Doutora Paola Mendes Milanesi

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Erechim,RS, 2022.

1. Agronomia. 2. Tratamento de sementes. I. , Paola
Mendes Milanesi, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EDUARDA MAIA PASSAGLIA

Controle de podridão de Sclerotinia e resistência sistêmica adquirida em plântulas de couve de bruxelas por meio de tratamento de sementes com indutores biótico e abióticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – campus Erechim, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Agronomia.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 22/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paola Mendes Milanesi
Orientadora

Profa. M.Sc. Daiani Brandler
Avaliadora

Dra. Ediane Roncaglio Baseggio
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente quero agradecer a Deus por sempre guiar meus passos e me abençoar durante toda essa minha caminhada.

A minha família, minha mãe e minha irmã por todo apoio e por não medirem esforços para me ajudar em tudo e os meus sobrinhos que mesmo pequenos e sem entender me proporcionaram todo apoio demonstrando isso com o carinho recebido por eles.

A minha orientadora Doutora Paola Mendes Milanesi, por confiar na minha capacidade e me oferecer a oportunidade de compor o grupo de pesquisa de fitopatologia, e por me dar todo o suporte necessário para elaboração desse projeto, e sempre me amparar em todos os momentos.

A minha coorientadora Mestra Daiani Brandler por não medir esforços e sempre me orientar quando precisei e por todo o incentivo na minha caminhada.

A todos os professores que passaram pela minha trajetória acadêmica. Agradeço também os funcionários da UFFS- campus Erechim que prestaram todo o auxílio e suporte para a execução deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório por prontamente me ajudarem nas atividades deste trabalho e por compartilharem os conhecimentos adquiridos.

Aos meus amigos que estiveram do meu lado me dando todo o apoio. Todos vocês fazem parte desse momento e contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho. Agradeço imensamente a todos.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Descrição dos tratamentos de sementes que serão utilizados e respectivas doses.....	16
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Germinação (%), incidência em rolo de papel (%), emergência à campo (%) e incidência em plântulas (%; aos 14 dias após a semeadura), em couve de Bruxelas, cujas sementes foram submetidas ou não a exposição com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com: *Saccharomyces cerevisiae* (T1); extrato etanólico de própolis marrom (EEP) a 30% (T2); quitosana a 3% (T3); acibenzolar-S-metil (T4); controle água (T5); controle - álcool de cereais (T6); e controle - ácido acético (T7).....22

Tabela 2. Teor de proteína (mg/g de tecido) e expressão da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL; Uabs/min/mg de proteína) em plântulas (aos 15 dias após a semeadura), provenientes de sementes de couve de bruxelas submetidas ou não a inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com: *Saccharomyces cerevisiae* (T1); extrato etanólico de própolis marrom (EEP) a 30% (T2); quitosana a 3% (T3); acibenzolar-S-metil (T4); controle água (T5); controle - álcool de cereais (T6); e controle - ácido acético (T7).....24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Placa de Petri contendo isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
Figura 2. Sementes de couve de bruxelas distribuídas sobre o meio de cultura BDA contendo o patógeno.....	17
Figura 3. Germinação (%) de sementes de couve de bruxelas inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , por meio de restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa), em relação a diferentes tempos de exposição (horas) ao patógeno.....	21

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

CONTROLE DE PODRIDÃO DE SCLEROTINIA E RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA EM PLÂNTULAS DE COUVE DE BRUXELAS POR MEIO DE TRATAMENTO DE SEMENTES COM INDUTORES BIÓTICO E ABIÓTICOS

Resumo: Entre as doenças que incidem sobre a couve de bruxelas, a podridão de *Sclerotinia*, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, pode provocar prejuízos no estabelecimento da cultura, causando o apodrecimento do caule e das folhas próximas ao solo. O controle do patógeno deve ser buscado, passando pela utilização de métodos alternativos ao controle químico. Objetivou-se verificar a eficiência de indutores biótico e abióticos sobre a qualidade fisiológica e incidência de podridão de *Sclerotinia* em sementes de couve de bruxelas e quantificar as respostas de resistência proporcionadas pelos tratamentos em plântulas dessa hortaliça. Foram utilizadas sementes de couve de bruxelas sem tratamento químico. O experimento foi conduzido na UFFS – Campus Erechim, em delineamento inteiramente casualizado, contendo 7 tratamentos, sendo: *Saccharomyces cerevisiae*; extrato etanólico de própolis marrom (EEP; 30%; diluído em água; concentração 10% de EEP/L); quitosana 3%; acibenzolar-S-metil; controle “água”; controle “álcool de cereais”; e controle “ácido acético” 1%. As sementes foram inoculadas com *S. sclerotiorum* pela técnica de restrição hídrica com o restritor manitol, assegurando um potencial hídrico de -0,6 MPa. Calibrou-se a curva de infecção das sementes após exposição ao patógeno nos tempos: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, a fim de selecionar o melhor período para a infecção e a manutenção do potencial germinativo das sementes ($\geq 80\%$ de germinação). Avaliou-se: *i*) germinação (%); *ii*) incidência (%) de *S. sclerotiorum*; *iii*) emergência à campo; e *iv*) incidência (%) de podridão de *Sclerotinia* em plântulas. As respostas de resistência induzida foram avaliadas por meio da atividade da determinação de proteínas solúveis totais e pela expressão da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a variável quantitativa (tempos de exposição das sementes à *S. sclerotiorum*), se significativa, foi realizada a análise de regressão polinomial. Verificou-se que o melhor tempo de exposição das sementes ao patógeno foi o de 4 horas. Os resultados demonstraram que o tratamento de sementes de couve de bruxelas com os diferentes indutores não proporcionou melhorias em relação a germinação e ao controle do patógeno. Os indutores testados também não asseguraram incremento na expressão de proteínas totais bem como da enzima FAL, indicando que estes possuem baixa ação de indução de resistência, nas doses utilizadas, quando aplicados em sementes de couve de bruxelas.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *gemmifera*; escleródios; apiagricultura; Indução de resistência.

CONTROL OF SCLEROTINIA ROOT AND SYSTEMIC RESISTANCE ACQUIRED IN BRUSSELS CABBAGE SEEDLINGS THROUGH SEED TREATMENT WITH BIOTIC AND ABIOTIC INDUCERS

Abstract: among the diseases that affect brussels sprouts, Sclerotinia rot, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, can cause damage to the establishment of the culture, causing the rotting of the stem and leaves close to the ground. The pathogen control must be sought, through the use of alternative methods to chemical control. The objective was to verify the efficiency of biotic and abiotic inducers on the physiological quality and incidence of Sclerotinia rot in brussels sprouts seeds and to quantify the resistance responses provided by the treatments in seedlings of this vegetable. Brussels sprouts seeds without chemical treatment were used. The experiment was carried out at UFFS – Campus Erechim, in a completely randomized design, containing 7 treatments, as follows: *Saccharomyces cerevisiae*; brown propolis ethanol extract; 3% chitosan; acibenzolar-S-methyl; “water” control); “grain alcohol” control; and control “acetic acid” 1%. The seeds were inoculated with *S. sclerotiorum* by the water restriction technique with the mannitol restrictor, ensuring a water potential of -0.6 MPa. The infection curve of the seeds was calibrated after exposure to the pathogen at the times: 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours, in order to select the best period for infection and maintenance of the germinative potential of the seeds ($\geq 80\%$ germination). It was evaluated: *i*) germination (%); *ii*) incidence (%) of *S. sclerotiorum*; *iii*) field emergency; and *iv*) incidence (%) of Sclerotinia rot on seedlings. Induced resistance responses were evaluated through the activity of determining total soluble proteins and by the expression of the enzyme Phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Data were submitted to analysis of variance and comparison of means by Tukey's test ($p \leq 0.05$). For the quantitative variable (times of exposure of seeds to *S. sclerotiorum*), if significant, polynomial regression analysis was performed. It was found that the best time of exposure of seeds to the pathogen was 4 hours. The results showed that the treatment of brussels sprouts seeds with the different inducers did not provide improvements in relation to germination and pathogen control. The tested inducers also did not ensure an increase in the expression of total proteins as well as the PAL enzyme, indicating that they have a low resistance induction action, at the doses used, when applied to brussels sprouts seeds.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *gemmifera*; sclerotia; apiculture; Induction of Resistance.

INTRODUÇÃO

A couve de bruxelas é muitas vezes descrita como um repolho em miniatura (LANA; TAVARES, 2010). Seu nome científico é *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* e pertence à família Brassicaceae. Por isso, algumas características são muito semelhantes com o repolho, couve e couve-flor. Essa cultura é rica em vitaminas A e C, e nutrientes como manganês, potássio, ferro e cálcio (LUENGO et al., 2011). A sua descoberta ocorreu no século XXIII, na Bélgica, na cidade de Bruxelas; devido a isso surgiu o seu nome, muito embora essa hortaliça só tenha sido conhecida em outros países no século XXV (PLANT GROWER, 2021).

As produções de brássicas são importantes para o mundo todo, e todas as culturas dessa família estão sujeitas a uma doença denominada podridão da *Sclerotinia*, cujo agente etiológico é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Ascomycota; MYCOBANK, 2021). Trata-se de um patógeno necrotrófico e cosmopolita, que causa doença em mais de 400 espécies botânicas distintas, tais como soja, girassol, ervilha, feijão, cenoura, alface e batata (DERBYSHIRE; DENTON, 2016). Esse patógeno é transmitido através de sementes infectadas, por isso torna-se importante o tratamento de sementes, para assim evitar a disseminação do mesmo (ALMEIDA et al., 2005).

Em se tratando da couve de bruxelas, ainda há carência de informações a respeito do manejo de doenças, bem como de métodos não exclusivamente pautados no uso de fungicidas químicos, tendo em vista a produção em consonância com a segurança alimentar.

As plantas estão sujeitas a sofrerem a incidência de patógenos, uma vez que estão expostas ao ambiente e suas mudanças, o que pode ser determinante dentro da consolidação do processo doença. Entretanto, com a evolução das espécies, as plantas tornaram-se hábeis em desenvolver mecanismos de resistência, sendo estes peculiares para cada tipo de planta, bem como de ataque. Tais mecanismos envolvem o reconhecimento frente a agressão recebida e a sinalização bioquímica como resposta (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999; FERNANDES et al., 2009).

A resistência de uma planta contra um determinado patógeno pode ser definida como a sua capacidade em atrasar e/ou evitar a entrada de um

microrganismo estranho (BONALDO et al., 2005), ativando seu mecanismo de defesa para diminuir a possibilidade de colonização pelo patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Nesse sentido, métodos como a utilização de indutores de resistência estão sendo cada vez mais buscados como uma forma de reduzir o uso de agrotóxicos para o controle de doenças nas culturas. A utilização de indutores de resistência, tanto biótico, quanto abiótico, é uma opção para o manejo de doença nas plantas e tem sua eficiência comprovada contra diversos patógenos (GURGEL et al., 2014). Entre os indutores mais utilizados, pode-se destacar o Acibenzolar-S-metil (ASM) e a quitosana (BARROS et al., 2010), sendo o ASM a única molécula ativadora de plantas devidamente registrada para uso comercial no Brasil (BARROS et al., 2010; MELO et al., 2017).

O ASM é semelhante ao ácido salicílico (AS) e atua induzindo a ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina. A quitosana, no entanto, possibilita a criação de uma barreira estrutural pela lignificação da parede celular ou pelo efeito inibitório sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos (RODRIGUES; BEZERRA NETO; COELHO, 2006; BARROS et al., 2010).

Outro produto alternativo com importante atividade antimicrobiana é o extrato etanólico de própolis (EEP). Entre os benefícios relatados, pode-se destacar a redução na incidência e na severidade de podridões de raízes causadas por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro (ABD-EL-KAREEM; SAIED; ELMOHAMEDY, 2018). Em feijão e cenoura, o extrato etanólico de própolis inibiu o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em condições de armazenamento, indicando que esse composto é um potente antifúngico (MATNY et al., 2014).

Leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, também apresentam potencial de bioprospecção no controle de fitopatógenos, visto que fazem parte da microbiota epifítica e endofítica das plantas (MELLO et al., 2011). O uso de quitina, proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, provoca aumento na resistência de tomateiro ao mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, uma importante doença em pós-colheita dos frutos. Esse efeito é assegurado pelo desencadeamento de uma série de respostas bioquímicas, tais como estresse oxidativo, acúmulo de RP-Proteínas e ativação da rota

metabólica relacionada ao ácido salicílico (SUN et al., 2018), indicando o potencial dessa levedura também como indutora de resistência em plantas contra patógenos.

Por ser um método alternativo de controle de doenças em plantas, a indução de resistência pode auxiliar na redução da aplicação de agrotóxicos (BONALDO et al., 2005). Nesse viés, tem sido demonstrado o potencial que os métodos alternativos para o tratamento de sementes e a sua relação com a indução de resistência em plântulas (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; MEDEIROS et al., 2009). Entretanto, pouco ainda é conhecido à respeito do uso de indutores de resistência aplicados no tratamento de sementes de couve de bruxelas, tendo em vista o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e a ativação de rotas metabólicas de resistência induzida em plântulas.

Diante do exposto, teve-se como objetivo com o presente trabalho verificar a eficiência de indutores de resistência biótico e abióticos sobre a qualidade fisiológica e incidência de podridão de *Sclerotinia* em sementes de couve de bruxelas e quantificar as respostas de resistência proporcionadas pelos tratamentos em plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia e na Área Experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim (RS), entre agosto de 2021 e julho de 2022. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com o número de repetições especificado dentro de cada teste.

Caracterização das sementes de couve de bruxelas: foram adquiridas sementes de couve de bruxelas, sendo estas sem tratamento químico. Imediatamente após o recebimento das sementes, realizou-se a caracterização fisiológica e sanitária das mesmas, determinando-se: *i) umidade:* 8%; *ii) condutividade elétrica:* 38,41 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$; *iii) germinação:* 89%, acima do padrão mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura para comercialização, que é de 75% (MAPA, 2013); e *iv) sanidade:* verificou-se incidência de fungos dos gêneros *Alternaria* (2%), *Aspergillus* (4%) e *Cladosporium* (12%).

Após esses testes iniciais, foram realizados os seguintes procedimentos:

Obtenção do isolado de Sclerotinia sclerotiorum: escleródios do fungo foram coletados a partir de hospedeiro botânico da família Brassicaceae. Para assegurar a obtenção de culturas puras de *Sclerotinia sclerotiorum*, os escleródios foram submetidos à assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 1 min e água destilada e esterilizada (três enxágues de 1 min cada).

Em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), os escleródios foram distribuídos e, na sequência, as placas foram incubadas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (PEREIRA et al., 2009). Após sete dias de incubação foi possível reconhecer as estruturas do patógeno (Figura 1A e B) e realizar a sua repicagem para novas placas contendo meio de cultura BDA, visando a manutenção das culturas do patógeno.

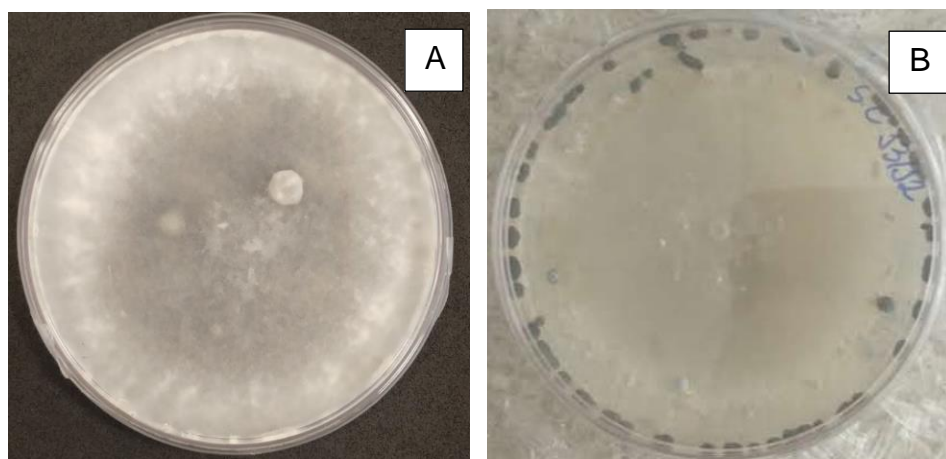


Figura 1. Aspecto do crescimento micelial, em meio de cultura BDA, do isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado (A); e formação de escleródios na borda da placa de Petri contendo meio de cultura BDA (B).

Fonte: A autora (2022).

Descrição dos tratamentos: foram avaliados os seguintes tratamentos, e respectivas doses, para aplicação via tratamento de sementes em couve de bruxelas (Quadro 1):

- Suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*: proveniente de fermento biológico fresco, disponível no comércio local (20 mg/mL); com $3,0 \times 10^4$ células mL; suspensão não autoclavada.
- Extrato etanólico de própolis marrom (EEP, 30%): diluído em água destilada esterilizada para obtenção da concentração de 10% de EEP/L.

- Quitosana: quitosana pura, obtida em farmácia de manipulação, dissolvida em ácido acético 1% com posterior diluição em água (FREDDO et al., 2012) para a obtenção da concentração de 3,0% (MAZARO et al., 2009).
- Acibenzolar-S-metil (ASM): produto comercial Bion 500 WG® (Syngenta), utilizado como indutor de referência; na concentração de 0,4 g produto comercial kg⁻¹ semente (DEBONA et al., 2009).
- Controle “água”: apenas água destilada e esterilizada.
- Controle “álcool de cereais”: somente álcool de cereais a 70%.
- Controle “ácido acético”: somente ácido acético a 1%.

Quadro 1. Descrição dos tratamentos de sementes que foram utilizados e respectivas doses.

Tratamento	Dose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3,0 x 10 ⁴ células mL, não autoclavada)	2,0 mL kg ⁻¹ semente
Extrato etanólico de própolis marrom (30%) (diluído em água para obtenção da concentração de 10% de EEP/L)	2,5 mL kg ⁻¹ semente
Quitosana 3%	2,0 mL kg ⁻¹ semente
Acibenzolar-S-metil	0,4 g p.c.* kg ⁻¹ semente
Controle “água” (apenas água destilada e esterilizada)	2,0 mL kg ⁻¹ semente
Controle “álcool de cereais” (somente álcool de cereais a 70%)	2,5 mL kg ⁻¹ semente
Controle “ácido acético” (somente ácido acético a 1%)	2,0 mL kg ⁻¹ semente

*p.c.: produto comercial. Volume final de calda (tratamentos + água destilada esterilizada): 6 mL kg⁻¹ semente.

A suspensão da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida a partir do isolamento de fermento biológico fresco, disponível no comércio local, cultivado em meio YEPG (10 g de extrato de levedura; 20 g de peptona; 20 g de glicose; 20 g de ágar e 1 L de água), com repicagens semanais. As células foram suspensas em água destilada após 48 h de isolamento com ajuste da concentração para 1 x 10⁵ células mL, com auxílio de câmara de Neubauer (GOUVEA et al., 2009).

Inoculação de sementes de couve de bruxelas com Sclerotinia sclerotiorum: a fim de assegurar maior eficiência na inoculação de *S. sclerotiorum* nas sementes, foi utilizada a técnica de restrição hídrica, tomando-

se como restritor osmótico o manitol ($C_6H_{14}O_6$). Primeiramente, o patógeno foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de manitol, com potencial hídrico de $-0,6$ MPa ($44,88$ g de manitol L^{-1} BDA) (COUTINHO et al., 2001; TORTELLI et al., 2020). As placas foram incubadas em BOD a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (PEREIRA et al., 2009) por sete dias, quando o patógeno alcançou a borda das placas de Petri.

Sementes de couve de bruxelas (previamente submetidas à assepsia com hipoclorito 1% por 1 min., seguidas por três enxágues em água destilada e esterilizada, 1 min. cada), foram distribuídas em camada única sobre o meio BDA contendo a cultura do patógeno (Figura 2). As sementes foram incubadas a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, permanecendo em contato direto com *S. sclerotiorum* por diferentes tempos de exposição (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas). À medida que as sementes foram removidas, passaram a ser deixadas para secar sobre papel toalha, em temperatura ambiente durante 24 horas (CRUCIOL; COSTA, 2017).

Com esse teste inicial foi possível estabelecer qual é o melhor tempo de exposição para inoculação de sementes de couve de bruxelas com *S. sclerotiorum* a fim de assegurar a germinação e o vigor das sementes, permitindo a aplicação e posterior avaliação dos tratamentos.



Figura 2. Sementes de couve de bruxelas distribuídas sobre o meio de cultura BDA contendo cultura de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fonte: A autora (2022).

Estabelecendo-se o melhor tempo de exposição ao inóculo do patógeno as sementes foram tratadas, conforme os tratamentos descritos no Quadro 1.

Após receberem os tratamentos, as sementes foram mantidas em temperatura ambiente durante 24 horas, para completa secagem dos produtos e, após isso, foram submetidas aos testes a seguir:

Germinação de sementes e incidência de S. sclerotiorum: conduzido com oito repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes (BRASIL, 2009a). As sementes foram distribuídas em caixas tipo 'gerbox' (devido ao tamanho diminuto das sementes) sobre duas folhas de papel *germitest* umedecidas com água destilada em 2,5 vezes o seu peso seco.

Após a semeadura, as caixas foram dispostas em incubadora BOD a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas por meio de contagens aos 05 e 10 dias após semeadura. Na primeira contagem contabilizou-se todas as sementes germinadas e que originaram plântulas normais. Na segunda contagem, as plântulas foram classificadas em normais, anormais e sementes não germinadas (duras e mortas). Os resultados foram expressos em percentual (%).

Para determinar a *incidência (%) de Sclerotinia sclerotiorum* foram utilizadas oito repetições de 25 sementes, totalizando uma amostra de 200 sementes (BRASIL, 2009b). O teste foi conduzido pelo método de "*blotter test*", em caixas "gerbox", contendo duas folhas de papel mata-borrão, umedecidas em 2,5 vezes o seu peso seco, e incubadas a 20 °C e fotoperíodo de 12 h, por 5 dias. As sementes foram analisadas com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, determinando-se o percentual (%) de incidência do patógeno nos tratamentos avaliados.

Emergência à campo: conduzido em casa de vegetação. As sementes inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e submetidas aos tratamentos foram semeadas em bandejas (200 células; 18 mL/célula) em quatro repetições de 50 sementes cada e regadas sempre que necessário. A avaliação de plântulas emergidas foi realizada aos quatorze (14) dias após a semeadura, considerando-se plântulas normais, cujo comprimento foi maior ou igual a 1,0 cm. Os resultados foram expressos em percentual (%) de plântulas emergidas por tratamento (MARCOS FILHO; KIKUTI, 2008).

Incidência de podridão de Sclerotinia: ao término da avaliação de emergência de plântulas, aos quatorze dias, foi quantificada a incidência de

podridão de *Sclerotinia* em cada tratamento. Os dados foram expressos em percentual (%) de plântulas doentes (MAZARO et al., 2009).

Análises bioquímicas: foram coletadas amostras de plântulas, após a finalização do teste de emergência a campo, quando as plântulas alcançaram 14 dias de idade. As amostras foram coletadas em todos os tratamentos e respectivas repetições, totalizando, aproximadamente, 0,5 g de material vegetal por repetição. Após a coleta, as plântulas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C até o momento de realização das análises.

Antes da realização de cada análise, as amostras foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó. Nessa etapa, procedeu-se a adição de 0,1 g/amostra do reagente *Dowex 1X8 chloride form* (Sigma Aldrich®), cuja finalidade era assegurar maior estabilidade às enzimas e proteínas ali presentes, evitando sua degradação.

Determinação dos níveis de proteínas solúveis: a concentração de proteínas foi mensurada pelo método Coomassie Blue (BRADFORD, 1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para isso, 0,5 g de material vegetal foi macerado em almofariz contendo nitrogênio líquido. Em seguida, a 0,5 g do macerado foi misturado 4 mL do tampão de extração (tampão fostato pH 7,5: 420 mL da solução A (35,61 g de K_2HPO_4 0,2 M em 1 L de água destilada); e 80 mL da solução B (27,6 g de KH_2PO_4 em 1 L de água destilada), e 500 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi retirado e, a ele, adicionou-se 2,5 mL de solução de Coomassie Blue. Após 5 minutos, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 595 nm.

Extração e quantificação da Fenilalanina amônia-liase (FAL): aproximadamente 1,0 g de material vegetal foi macerado em almofariz previamente gelado, com 6,0 mL do tampão de extração contendo 22,2 g de Tris; 0,37 g de EDTA; 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP e o volume foi completado para 1000 mL de água destilada, após ajustar o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N. A mistura foi centrifugada a 6000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e diluído antes da análise da atividade enzimática e da determinação da proteína solúvel.

A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (RODRIGUES et al., 2006). Nos tubos de ensaio foram pipetados 1,5 mL de cada extrato enzimático, acrescido de 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg/mL) na prova em "branco". A mistura foi incubada a 40 °C por 1 h, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras espectrofotométricas a 290 nm.

Análise estatística: os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *software* SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre os tempos de exposição das sementes ao patógeno e, desta forma, não foi possível ajustar uma curva entre os tempos avaliados, por meio da análise de regressão polinomial. O percentual de germinação, em todos eles, foi superior a 80%. A germinação média obtida foi de 87,3% (Figura 3) Portanto, o tempo utilizado para a inoculação das sementes de couve de bruxelas, tomando por base essa avaliação inicial, foi àquele com o maior percentual, ou seja, após 4 horas de exposição das sementes ao patógeno, que assegurou 90% de germinação (Figura 3).

Deve-se levar em consideração para a escolha do melhor tempo de exposição de sementes ao patógeno, aquele que assegura um percentual germinativo das sementes maior ou igual a 80% (TORTELLI et al., 2020). Isso foi verificado por meio de teste de germinação, para cada tempo de exposição.

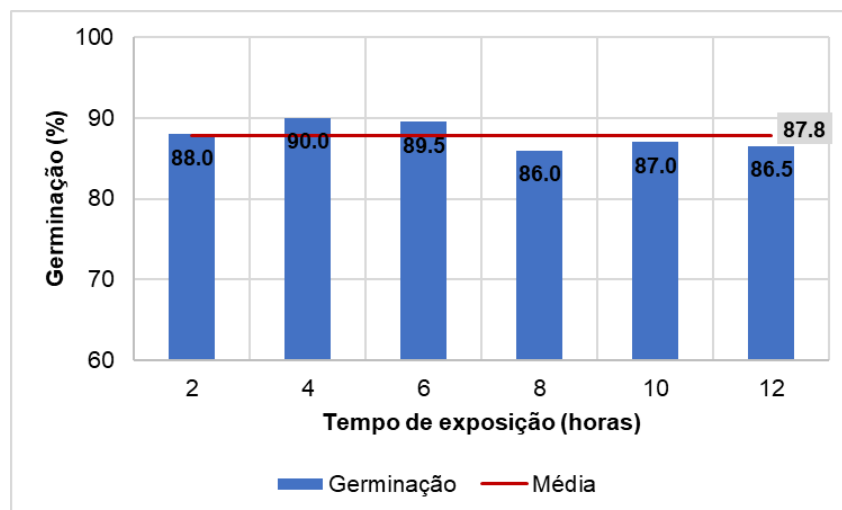


Figura 3. Germinação (%) de sementes de couve de bruxelas inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio de restrição hídrica com manitol (-0,6 MPa), em relação a diferentes tempos de exposição (horas) ao patógeno.

Os resultados de germinação após a exposição ao patógeno e aplicação dos tratamentos de sementes são apresentados na Tabela 1. Observou-se que o melhor desempenho foi obtido em T6 (controle - álcool de cereais), porém não houve diferença significativa em comparação ao T1, T2 e T5. Vieira et al. (2010) após realizarem testes na cultura do feijoeiro, utilizando papel *germitest*, concluíram que a solução de EEP não inibe a germinação, o que corrobora os resultados observados no presente trabalho.

A pior resposta foi observada em T4 (acibenzolar-S-metil, ASM), diferindo significativamente dos demais tratamentos. Segundo Soares e Maringoni (2002) o tratamento de sementes de feijoeiro com ASM na dose de 2,5 g.i.a/100 kg de semente teve efeito fitotóxico, o que resultou na redução dos índices de germinação de sementes.

Na variável emergência a campo (Tabela 1) o melhor desempenho foi obtido em T5 (controle água) e o tratamento que apresentou o pior índice foi T2 (EEP a 30%), destoando dos resultados observados na germinação das sementes de couve de bruxelas.

Tabela 1. Germinação (%), incidência em rolo de papel (%), emergência à campo (%) e incidência em plântulas (%; aos 14 dias após a semeadura), em couve de bruxelas, cujas sementes foram submetidas ou não a exposição com *Sclerotinia*

sclerotiorum e tratadas com: *Saccharomyces cerevisiae* (T1); extrato etanólico de própolis marrom (EEP) a 30% (T2); quitosana a 3% (T3); acibenzolar-S-metil (T4); controle água (T5); controle - álcool de cereais (T6); e controle - ácido acético (T7).

Tratamento	Germinação	Incidência ¹	Emergência ¹	Incidência ¹
	----- % -----			
T1	82,5 ab ²	15,0 a	52,0 b	14,5 a
T2	84,0 ab	6,5 b	27,0 c	6,5 ab
T3	77,0 b	2,0 b	50,0 b	3,0 b
T4	15,5 c	3,5 b	37,5 bc	3,5 ab
T5	86,0 ab	5,0 b	81,0 a	5,0 ab
T6	87,0 a	1,5 b	52,0 b	1,0 b
T7	0,0 d	0,0 b	0,0 d	0,0 b
Média	61,7	4,7	42,7	4,7
C.V. (%) ³	6,9	32,2	10,4	43,6

¹ Transformação $\sqrt{x+1}$. ² Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ³ Coeficiente de variação.

O T7 (controle - ácido acético) inibiu a germinação, tanto nos testes conduzidos em laboratório, quanto nos testes a campo em casa de vegetação. Por esse motivo, não foi possível quantificar as respostas de resistência induzida em plântulas desse tratamento. Neves e Moraes (2005) também observaram redução nos níveis de germinação, desde a primeira contagem, com tratamentos em sementes de arroz utilizando ácido acético.

Segundo Pascholati (1999) os indutores de resistência podem causar efeitos colaterais e afetar a fisiologia da planta, pois a ativação das vias de defesa das plantas pode acarretar em perdas energéticas para as mesmas.

Em relação a incidência de *Sclerotinia sclerotiorum*, nos testes realizados em laboratório, o menor índice da doença foi verificado em T6 (controle - álcool de cereais), mesmo não diferindo estatisticamente de T2, T3, T4 e T5. Segundo Ritter (2018) o tempo de exposição que a semente fica em contato com o EEP (T2) interfere nos efeitos da solução para o controle de diversas doenças. O autor ainda salienta que quanto maior o tempo de exposição da semente com a solução, maior é o nível de controle, mesmo com doses mínimas do EEP. Tal

fato pode justificar o resultado obtido no presente trabalho, haja vista que o álcool de cereais 70% foi utilizado como veículo para obtenção do EEP.

Sendo assim, esse álcool também teria efeito no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. Wuaden et al. (2018) também observaram a eficiência *in vitro* do álcool de cereais 70% no controle de *Botrytis cinerea*. Os autores ressaltam que, quando é realizada a autoclavagem desse álcool, há redução na efetividade de controle que ele apresenta sobre o patógeno.

Para Mazaro et al. (2009) a quitosana em concentração 2,5% proporcionou uma menor incidência de tombamento em plântulas de beterraba e tomate. Isto pode-se comparar com os resultados obtidos no presente trabalho em que constatou-se que a quitosana (T3) destacou-se como um dos tratamentos com a menor incidência do patógeno, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

No presente trabalho, o pior controle do patógeno foi obtido em T1 (*Saccharomyces cerevisiae*). Tais resultados foram replicados quando se avaliou a incidência do patógeno em condições de casa de vegetação (Tabela 1). Contrariamente ao observado nesta pesquisa, Gouvea et al. (2009) ao avaliar o efeito de preparações de *Saccharomyces cerevisiae* contra doenças do morangueiro e a qualidade pós-colheita dos frutos, constataram uma redução de incidência de mofo-cinza em pós-colheita de frutos.

Com relação as respostas bioquímicas de indução de resistência, para o teor de proteínas totais, não houve efeito significativo na comparação entre os tratamentos avaliados (Tabela 2). Porém, denota-se que os tratamentos controle - com água destilada (T5), controle - com álcool de cereais (T6) e quitosana 3% (T3) apresentaram ligeiro acréscimo no teor de proteínas e, muito embora não tenham diferido, obtiveram uma média de 14,23 mg de proteína g⁻¹ tecido. Além disso, no indutor ASM (T4) percebeu-se a menor média de expressão de proteínas (13,27 mg de proteína g⁻¹ tecido).

Em função de não ter havido plântulas emergidas em T7 (ácido acético; Tabela 1), não se pode realizar a coleta de amostra para essas análises. Resultados semelhantes foram encontrados por Cruz (2016) o qual constatou que após a imersão de sementes de angico branco, por 2 minutos, nos tratamentos ácido salicílico (2,0 mM), fenilalanina (2,0 mM), fosfito de potássio (0,001%) e ASM (0,005%), visando o controle de *Fusarium* sp., não demonstraram efeito significativo sobre o teor de proteínas totais.

Tabela 2. Teor de proteínas totais (mg/g de tecido) e expressão da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL; Uabs/min/mg de proteína) em plântulas (aos 15 dias após a semeadura), provenientes de sementes de couve de bruxelas submetidas ou não a inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com: *Saccharomyces cerevisiae* (T1); extrato etanólico de própolis marrom (EEP) a 30% (T2); quitosana a 3% (T3); acibenzolar-S-metil (T4); controle água (T5); e controle - álcool de cereais (T6).

Tratamento	Proteínas totais	FAL
	mg/g tecido	Uabs/min/mg de proteína
T1	13,43 ^{ns}	0,00155 b ¹
T2	12,78	0,00132 b
T3	14,01	0,00147 b
T4	13,27	0,00180 a
T5	14,22	0,00157 b
T6	14,46	0,00135 b
Média	13,64	0,00155
C.V. (%) ²	6,83	18,07

¹ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ² Coeficiente de variação. ^{ns} Não significativo.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi estimulada com a aplicação do ASM (T4) o qual obteve a melhor resposta, uma vez que houve diferenças em comparação aos resultados da testemunha. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Danner et al. (2008) constataram que o uso ASM como indutor de resistência aumentou a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em plântulas de beterraba e tomate. Para Bertoncelli et al. (2014), após realizar o tratamento de sementes de soja com ASM, denotaram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, para a atividade da FAL.

Guimarães et al. (2015) observaram que a alta atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, está relacionada com a biossíntese de metabólitos ativos como fitoalexinas, fenóis, ligninase e ácido salicílico nos meios de defesa da planta, que atuam contra estresses bióticos ou abióticos.

Conforme os resultados demonstrados no presente trabalho, percebe-se que os tratamentos de semente utilizados para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em couve de bruxelas não expressaram melhorias no quesito germinação, assim como no controle do patógeno. No entanto, para proteína e FAL, os resultados indicam que os indutores avaliados apresentam reduzida ação de indução de resistência quando aplicados em sementes de couve de

bruxelas e, cujas plântulas, são coletadas 15 dias após a semeadura (DAS). Isso não quer dizer que, se as plântulas fossem analisadas com um intervalo menor de DAS, a expressão de proteínas totais e FAL, os teores encontrados seriam iguais aos obtidos. Isso indica uma possibilidade para estudos futuros, em que isso possa ser averiguado.

Portanto, enfatiza-se que estudos e pesquisas continuem sendo realizados, para que assim, cada vez mais, obtenha-se informações e resultados sobre as melhores formas de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* por meio de métodos alternativos e não exclusivamente dependentes de controle químico.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente trabalho foi conduzido, pode-se concluir que:

O tratamento de sementes, com indutores biótico e abióticos, não estimula a germinação e emergência de plântulas em ambas as condições, *in vitro* e *in vivo*.

A incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* não é afetada pelo tratamento de sementes com Acibenzolar-S-metil (ASM).

O tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* (T1) não apresenta controle do patógeno em sementes de couve de bruxelas.

O tratamento com ácido acético (T7) inibe completamente a germinação de sementes de couve de bruxelas, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

O tratamento T4 (ASM) estimula a atividade da FAL em plântulas de couve de bruxelas, mesmo passados 15 dias após a semeadura.

REFERÊNCIAS

ABD-EL-KAREEM, F. et al. Seed treatment with chitosan and ethanol-extracted propolis for suppression bean root rot disease under greenhouse conditions. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 9, n. 8, p. 2356- 2361, 2018.

ALMEIDA, A. M. R. et al. **Doenças das plantas cultivadas**. Manual de Fitopatologia. Vol. 2 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

BARROS, F. C. et al. **Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos**. Bioscience Journal, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BERTONCELLI, D.J. et al. **Tratamento de sementes com Acibenzilar-S-metílico e o efeito sobre *Pythium* spp. in vitro**. In: Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. 2014.

BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Piracicaba, 2005, p. 166.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009a.

COUTINHO, W. M. et al. **Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz e feijão submetidas ao teste de sanidade em meio ágar-água**. Revista Brasileira Sementes, v. 23, n. 2, 2001.

CRUCIOL, G. C. D.; COSTA, M. L. N. **Influence of *Macrophomina phaseolina* inoculation methodologies on the performance of soybean cultivars**. Summa Phytopathologica, v. 44, n. 1, 2017.

CRUZ, M. P. da. **Potencial de indutores de resistência no tratamento de sementes de angico-branco (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan) e no controle de *Fusarium* sp. em condições in vitro**. 2016. Disponível em: <<https://publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaconhecimento/article/view/6650>>. Acesso em: 12 de ago. 2022.

DANNER, M.A et al. **Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, p.793-799, 2008.

DEBONA, D. et al. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e Acibenzolar-S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1. 2009.

DERBYSHIRE M.; DENTON, G. M. **The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*):** current practices and future opportunities. Plant Pathology. 2016. Disponível em: <<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12517>>. Acesso em: 4 de mar. 2021.

FERNANDES, C.F. et al. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos.** Porto Velho, 2009. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/710939/1/133fitopatogenos.pdf>;Mecanismos> Acesso em: 2 de mar. 2021.

FERREIRA, D.F. **Sisvar:** a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FREDDO, Á.R. et al. **Efeito da quitosana na emergência, desenvolvimento inicial e caracterização bioquímica de plântulas de *Acacia mearnsii*.** Revista Árvore, v. 36, n. 6, p. 1039- 1046, 2012.

GOUVEA, A. et al. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4, 2009.

GUIMARÃES, S. et.al. Potential of horsetail (*Equisetum* sp.) derivatives on the synthesis of defense metabolites using soybean (*Glycine max* L.) cotyledons and their effect on the in vitro growth of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 1, p. 143-149, 2015.

GURGEL, L.M.S. et al. **Metodologia alternativa no manejo da antracnose pós colheita em *Heliconia rostrata*.** Pesquisa Agropecuária Pernambucana, v. 19, n. 1, p. 20-24, 2014.

LUENGO, R. F. A. et al. **Tabela de composição nutricional das hortaliças. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças**, 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355126/9124396/Tabela%2BNutricional%2Bde%2BHortali%25C3%25A7as/d4ae0965-9e94-4f19-a20e-b7721bdc1266>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A.L.P. **Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas em campo.** Horticultura Brasileira, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2008.

- MARGIS-PINHEIRO, M. et al. **Defesa das plantas contra as doenças.** Ciência Hoje, v. 25, n. 147, p. 24-31, 1999.
- MATNY, O.N. et al. **Activity of propolis and *Boswellia* sp. resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditions.** Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, v. 2, n. 1, p. 65-71, 2014.
- MAZARO, S.M. et al. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento das sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1424- 1430, 2009.
- MELLO, M. R. F. et al. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 78-83, 2011.
- MELO, T.A. et al. Produtos naturais disponíveis comercialmente induzem o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.205-211, 2017.
- MYCOBANK. ***Sclerotinia sclerotiorum***. (2021). Disponível em:<<https://www.mycobank.org/page/Basic%20names%20search>>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- NEVES, L.A.S.; MORAES, D.M. Análise do vigor e da atividade da α -amilase em sementes de cultivares de arroz submetidas a diferentes tratamentos com ácido acético. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.4, n.1, p.35-43, 2005
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 1-51, 1994.
- PEREIRA, C.E. et al. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2390-2395, 2009
- PLANT GROWER. **Brussel sprouts, *Brassica oleracea* var *gemmifera***. University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. 2021. Disponível em:<<https://www.plantgrower.org/brussel-sprouts.html>>. Acesso em: 04 mar.2021.
- RITTER, A. F.S. **Efeito do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja.** Disponível em: <https://eventos.uceff.edu.br/eventosfai_dados/artigos/agrotec2018/931.pdf>. Acesso em 22 de jul. 2022.
- RODRIGUES, A. A. et al. 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, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra

Ralstonia solanacearum. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 3, p. 189-196. 2007.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 41-45, 2002.

SUN, C. et al. **Chitin isolated from yeast cell wall induces the resistance of tomato fruit to *Botrytis cinerea***, Carbohydrate Polymers, v. 199, p. 314-352, 2018.

TORTELLI, B. et al. Treatments for *Sclerotinia sclerotiorum* on inoculated bean seeds and effects on health and physiological quality. **Journal of Agricultural Studies**, v.8, n. 1, p. 371- 386, 2020.

VIEIRA, C. et al. Efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 5, n. 1, 2010.

WUADEN, C. R. et al. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de própolis e do óleo essencial de manjeriço sobre *Botrytis cinerea*. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n. 2, p. 48-55, 2018.