

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE AGENTES BIÓTICOS E ABIÓTICOS APLICADOS
EM PÓS-COLHEITA NA PROTEÇÃO DE UVA ‘ITÁLIA’ CONTRA
*Botrytis cinerea***

ELISANGELA CLARETE CAMILI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU – SP
Janeiro – 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE AGENTES BIÓTICOS E ABIÓTICOS APLICADOS
EM PÓS-COLHEITA NA PROTEÇÃO DE UVA ‘ITÁLIA’ CONTRA
*Botrytis cinerea***

ELISANGELA CLARETE CAMILI

Orientadora: Dr. Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU – SP
Janeiro – 2004

REPRODUÇÃO
AUTORIZADA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C183a Camili, Elisangela Clarete, 1977-
Avaliação de agentes bióticos e abióticos aplicados em
pós - colheita na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis*
cinerea / Elisangela Clarete Camili. -- Botucatu, [s.n.],
2004.
viii, 156 f. : il. color., gráfs., tabs.
Dissertação(mestrado) -- Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas.
Orientador: Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva.
Co-orientador: Sérgio Florentino Pascholati.
Inclui bibliografia.
1. Mofo(Botânica) - Controle. 2. Ácido acético.
3. Quitosana. 4. Proteção. I. Silva, Eliane Aparecida
Benato Rodrigues da. II. Pascholati, Sérgio Florentino.
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agrônomicas. IV. Título.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

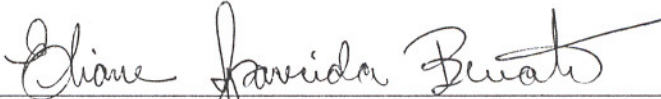
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE AGENTES BIÓTICOS E ABIÓTICOS APLICADOS EM
PÓS-COLHEITA NA PROTEÇÃO DE UVA 'ITÁLIA' CONTRA Botrytis
cinerea"

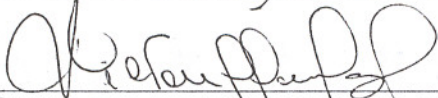
ALUNO: ELISANGELA CLARETE CAMILI

ORIENTADORA: PROFª DRª ELIANE AP. BENATO RODRIGUES DA SILVA

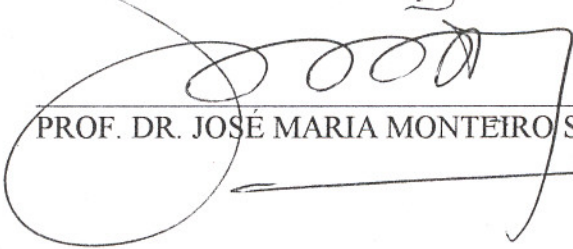
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFª DRª ELIANE AP. B. RODRIGUES DA SILVA



PROF. DR. NILTON LUIZ DE SOUZA



PROF. DR. JOSÉ MARIA MONTEIRO SIGRIST

Data da Realização: 26 de janeiro de 2004

Aos meus pais, **Walter e Eurenice** e ao **Renan**, pelo apoio, carinho, compreensão e, sobretudo, exemplo de vida, que me possibilitaram vencer.

Aos meus irmãos, **Márcio, Ednilce, Eloneida e Matheus**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida e saúde e por me permitir mais esta vitória;

À **Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA**, UNESP, Câmpus de Botucatu, onde, com orgulho e imensa gratidão, realizei a Graduação, e agora, concluo o curso de Mestrado;

A **Dra. Eliane Ap. Benato Rodrigues da Silva**, pela orientação, ensinamentos, incentivo e amizade;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Sérgio Florentino Pascholati**, pela amizade, dedicação e inestimável ajuda na realização dos experimentos;

Ao Prof. **Dr. Nilton Luiz de Souza**, meu eterno orientador, a quem agradeço para sempre, pela amizade, paciência e incontáveis momentos de compreensão e ensinamentos;

Aos pesquisadores **Dr. José Maria Monteiro Sigrist**, **MSc. Silvia Valentini** e, **Dr. Alfredo Vitali**, aos funcionários, **Luciane, Fábio, Quitéria** e **Raimundo**, do FRUTHOTEC / ITAL, pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho;

A Eng^a Agr^a MSc. **Patrícia Cia**, pelo carinho, amizade e inestimável ajuda na montagem dos experimentos e redação dos trabalhos;

Às incansáveis Técnicas em Alimentos **Débora Belo Alves** e **Thaís Saran Marini**, pela amizade, dedicação e apoio na realização das análises de laboratório, mesmo aos finais de semana;

Ao **Centro de Tecnologia de Hortifrutícolas – FRUTHOTEC**, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, pelo apoio e subsídios oferecidos para a realização dos experimentos;

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação da Horticultura, **Prof. Dr. Lin Chau Ming**, pela ajuda financeira para desenvolvimento do projeto e participação em eventos;

Aos **professores do Departamento de Produção Vegetal – Horticultura**, pelos conhecimentos transmitidos e a seus funcionários, especialmente, à secretária **Rosimeire**, pela atenção e pronto atendimento às minhas solicitações;

A todos os funcionários da **Biblioteca e da seção de Pós-graduação da FCA**, pelo auxílio e atenção ao longo desses anos;

Ao **Departamento Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Setor de Fitopatologia - ESALQ/USP**, por ter colocado à minha disposição os laboratórios e as disciplinas por ele oferecidas;

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq**, pelo suporte através de bolsa de estudos concedida durante parte da realização da dissertação;

Aos demais amigos e colegas do FRUTHOTEC, da FCA e da ESALQ, pelo companheirismo;

A todas as pessoas que, de formas diferentes, colaboraram para esta dissertação, a autora agradece.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO.....	05
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
4.1 Aspectos da pós-colheita de uvas de mesa (<i>Vitis vinifera</i>).....	09
4.2 Aspectos do patógeno (<i>Botrytis cinerea</i>).....	12
4.3 Indução de resistência.....	21
4.4 Agentes bióticos e abióticos.....	29
4.4.1 Agentes bióticos.....	29
4.4.1.1 <i>Lentinula edodes</i>	29
4.4.1.2 <i>Agaricus blazei</i>	31
4.4.2 Agentes abióticos.....	32
4.4.2.1 Quitosana.....	32
4.4.2.2 Ácido Acético.....	37
4.4.2.3 Irradiação UV-C.....	40
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1 Obtenção de isolados de <i>Botrytis cinerea</i>	44
5.2 Teste de patogenicidade e inoculação de <i>Botrytis cinerea</i> nos cachos de uva ‘Itália’	45
5.3 Efeito dos agentes de controle na proteção de uva ‘Itália’	46
5.3.1 <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinula edodes</i>	46
5.3.2 Quitosana.....	47
5.3.3 Ácido acético.....	47
5.3.4 Irradiação UV-C.....	48
5.3.5 Análises fitopatológicas e análise dos dados.....	49
5.3.6. Análises físicas e físico-químicas das uvas.....	50

5.4 Efeito dos agentes de controle sobre <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	51
5.4.1 <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinula edodes</i>	52
5.4.2 Quitosana.....	52
5.4.3 Ácido acético.....	53
5.4.4 Irradiação UV-C.....	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6.1 <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinula edodes</i>	54
6.1.1 Efeito dos extratos dos basidiocarpos na proteção de uva ‘Itália’	54
6.1.1.1 Tratamento pós-inoculação.....	54
6.1.1.2 Tratamento pré-inoculação com <i>Agaricus blazei</i>	57
6.1.2 Efeito dos extratos de <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinula edodes in vitro</i> na germinação de conídios e no crescimento radial de <i>Botrytis cinerea</i>	60
6.2 Quitosana.....	63
6.2.1 Efeito da solução de quitosana na proteção de uva ‘Itália’	63
6.2.1.1 Tratamento pós-inoculação.....	63
6.2.1.2 Tratamento pré-inoculação.....	67
6.2.2 Efeito da solução de quitosana <i>in vitro</i> na germinação de conídios e no crescimento radial de <i>Botrytis cinerea</i>	70
6.3 Ácido acético.....	74
6.3.1 Efeito da vaporização de ácido acético na proteção de uva ‘Itália’	74
6.3.1.1 Tratamento pós-inoculação.....	74
6.3.1.2 Tratamento pré-inoculação.....	77
6.3.2 Efeito do vapor de ácido acético <i>in vitro</i> na germinação de conídios e no crescimento radial de <i>Botrytis cinerea</i>	81
6.4 Irradiação UV-C.....	84
6.4.1 Efeito da irradiação UV-C na proteção de uva ‘Itália’	84
6.4.1.1 Tratamento pós-inoculação.....	84
6.4.1.2 Tratamento pré-inoculação.....	88
6.4.1.3 Contagem dos conídios de <i>Botrytis cinerea</i> em bagas de uva irradiadas com UV-C.....	92

6.4.2 Efeito da irradiação UV-C <i>in vitro</i> na germinação de conídios e no crescimento radial de <i>Botrytis cinerea</i>	94
7 CONCLUSÕES.....	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
APÊNDICES.....	130

1 RESUMO

Perdas significativas ocorrem durante o armazenamento e a comercialização de uvas de mesa devido, principalmente, à ocorrência do mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) e, visando o controle de patógenos emprega-se, geralmente, o dióxido de enxofre (SO₂). Diante da restrição crescente ao uso de produtos químicos em pós-colheita, tem ocorrido considerável interesse em métodos alternativos de controle. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos dos agentes bióticos (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinem) e abióticos (quitosana, ácido acético e irradiação UV-C), possíveis indutores de resistência, na proteção de uva 'Itália' pós-colheita contra *B. cinerea*. *In vivo*, avaliou-se o efeito direto e indireto dos agentes de controle através do tratamento dos cachos de uva, antes e após a inoculação com o patógeno. Utilizaram-se extratos aquosos dos cogumelos *A. blazei* (linhagem ABL 29) e *L. edodes* (linhagem LED 17) nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 40,0 % (v/v); quitosana nas concentrações de 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 % (v/v); vapor de ácido acético a 0,0; 2,6; 5,2; 10,5 ou 21,0 mg.L⁻¹ e; irradiação UV-C (254 nm) nas doses de 0,00; 0,84; 1,30; 2,40; 3,60; 4,80 e 7,50 kJ.m⁻². Para inoculação, em cada cacho foram feridas 10 bagas, fazendo-se um furo por baga de ±2 mm de profundidade, procedendo-se em seguida, a aspersão da suspensão de conídios

($\pm 10^5$ conídios.mL⁻¹) de *B. cinerea*. Após os tratamentos, os cachos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR; quando avaliações de incidência e severidade foram realizadas diariamente, além de análises físicas e físico-químicas da uva. Avaliações *in vitro* do efeito dos agentes de controle sobre o patógeno também foram realizadas analisando-se o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *B. cinerea*. Os resultados mostraram que os extratos de *A. blazei* e *L. edodes* não controlaram a podridão causada por *B. cinerea* em uva 'Itália', quando aplicados após a inoculação. No entanto, quando aplicado 96 h antes da inoculação, o extrato de *A. blazei* (5 %) reduziu a severidade da podridão nas uvas, porém, não de modo significativo. Quanto à solução de quitosana, nas concentrações de 1,5 e 2,0 % (v/v), quando empregada após a inoculação com *B. cinerea*, a mesma reduziu significativamente o índice de doença; no entanto, quando os cachos foram tratados antes da inoculação, não houve efeito significativo do tratamento sobre o desenvolvimento da doença. O vapor de ácido acético controlou a podridão de *B. cinerea* em uva, tanto em cachos previamente inoculados, como em cachos inoculados após o tratamento, sendo as uvas inoculadas após 48 h do tratamento, as que apresentaram menor índice de doença. Quanto à irradiação UV-C, observou-se uma tendência de redução no desenvolvimento de *B. cinerea* nos cachos tratados com as menores doses. Contudo, a irradiação UV-C acarretou bronzeamento nos cachos de uva. Nos ensaios *in vitro*, ambos os extratos dos cogumelos estimularam a germinação dos conídios de *B. cinerea* nas concentrações testadas; quanto ao crescimento micelial, *L. edodes* retardou, enquanto *A. blazei* estimulou. A solução de quitosana, nas maiores concentrações, suprimiu o crescimento micelial do patógeno e retardou a germinação dos conídios. Por sua vez, o ácido acético suprimiu a germinação dos conídios e inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea*. A porcentagem de germinação dos conídios, irradiados com diferentes doses de UV-C, foi inferior à testemunha. A avaliação do efeito da irradiação UV-C sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* revelou que, assim como no teste de germinação dos conídios, a UV-C mostrou retardar o crescimento do fungo. De todos os agentes estudados, quitosana e ácido acético mostraram-se os mais promissores no controle do mofo cinzento, merecendo continuidade nas pesquisas e investigações quanto à indução de mecanismos de resistência em uvas.

EVALUATION OF BIOTIC AND ABIOTIC AGENTS IN THE POST HARVEST PROTECTION OF 'ITÁLIA' GRAPES AGAINST *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. Botucatu, 2004. 156p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ELISANGELA CLARETE CAMILI

Adviser: ELIANE APARECIDA BENATO RODRIGUES DA SILVA

Co-Adviser: SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

2 SUMMARY

Significant losses of table grapes occur during storage and commercialization due mainly to the occurrence of gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.), and sulfur dioxide (SO₂) is frequently used to control such pathogens. Due to increasing restrictions on the postharvest use of chemical products, considerable interest in alternative control measures has arisen. The main objective of this study was to evaluate the effects of biotic (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinem) and abiotic (chitosan, acetic acid and UV-C irradiation) agents as possible resistance inducers in 'Itália' grapes, aimed at post-harvest protection against *B. cinerea*. The direct and indirect effects of these control agents were evaluated *in vivo* by treating bunches of grapes before and after inoculation with the pathogen. Aqueous extracts of the mushrooms *A. blazei* (strain ABL 29) and *L. edodes* (strain LED 17) were used in the concentrations of 0.0; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 and 40.0 % (v/v); chitosan at 0.00; 0.25; 0.50; 1.00; 1.50 and 2.00 % (v/v); acetic acid vapor at 0.0; 2.6; 5.2; 10.5 and 21.0 mg.L⁻¹ and UV-C (254 nm) irradiation at doses of 0.00; 0.84; 1.30; 2.40; 3.60; 4.80 and 7.50 kJ.m⁻². For inoculation, 10 grapes in each bunch were injured by piercing the grape to a depth of ±2 mm, followed by spraying with the inoculum of *B. cinerea*

conidia ($\pm 10^5$ conidia.mL⁻¹). After the treatments, the bunches were kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % RH, carrying out daily evaluations of disease incidence and severity, as well as physical and physical-chemical analyses of the grapes. *In vitro* evaluations of the effect of the control agents were also carried out based upon mycelial growth and germination of *B. cinerea* conidia. The results showed that the extracts of *A. blazei* and *L. edodes* failed to control deterioration by *B. cinerea* in 'Itália' grapes when applied after inoculation. However, the *A. blazei* extract (5 %) reduced the severity of the deterioration of the grapes when applied 96 h before inoculation, although not to a significant extent. When applied after inoculation with *B. cinerea*, 1.5 and 2.0 % (v/v) solutions of chitosan significantly reduced the occurrence of the disease, although when applied before inoculation, there was no significant effect on the development of the disease. The acetic acid vapor controlled deterioration of grapes by *B. cinerea* both in bunches inoculated before treatment and in those inoculated after treatment, those inoculated 48 h after treatment presenting the greatest resistance. Smaller doses of UV-C irradiation showed a tendency to reduce the development of *B. cinerea* in bunches of grapes, but UV-C irradiation led to browning of the bunches of grapes. In the *in vitro* trials, both extracts of mushroom stimulated germination of the *B. cinerea* conidia at the concentrations tested, whereas with respect to mycelial growth, *L. edodes* delayed growth but *A. blazei* stimulated it. The higher concentrations of chitosan suppressed mycelial growth of the pathogen and retarded germination of the conidia, whilst acetic acid suppressed germination of the conidia and prevented mycelial growth of the *B. cinerea* colonies. The percent germination of conidia in samples irradiated with the different doses of UV-C was always lower than in the non-treated samples. With respect to the effect of UV-C on the mycelial growth of *B. cinerea* colonies, the evaluation showed that, as in the case of conidia germination, UV-C retarded colony growth. Of all the agents studied, chitosan and acetic acid were shown to be the most promising on the control of gray mold, suggesting the need to continue research and investigation into the induction of resistance mechanisms in grapes by these agents.

Keywords: *Vitis vinifera* L., gray mold, induced resistance, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, chitosan, acetic acid, UV-C irradiation, control.

3 INTRODUÇÃO

Em 2002, o Brasil produziu aproximadamente 1,1 milhão de toneladas (t) de uva em uma área de 65,5 mil hectares (ha), perfazendo uma produtividade de 17 t/ha. A região Sul é a maior produtora nacional de uvas, com cerca de 690 mil t no ano de 2002, correspondente a 63% da produção nacional, seguida pelas regiões Sudeste (20%) e Nordeste (17%) (AGRIANUAL, 2003).

Na região Sudeste, representada, principalmente, pelo estado de São Paulo, há predominância no cultivo de uvas de mesa. Do total produzido, as uvas finas de mesa perfazem 65%, representadas pelas cultivares Itália e Rubi, as quais são cultivadas principalmente na região Sul do estado, nos municípios de São Miguel Arcanjo, Pilar do Sul e Buri, constituindo a zona produtora mais importante (POMMER; MAIA, 2003; MELLO, 2003). A cultura cresceu muito nos últimos anos nas regiões Oeste e Noroeste do estado de São Paulo, destacando-se a região de Jales/SP, com produção de uvas 'Itália' e 'Rubi' (TERRA, 1998).

Em nível nacional, no período de 1991 a 1999, obteve-se uma taxa de crescimento nas exportações de uva de 180%, graças à expansão da viticultura de mesa nas regiões Sudeste e Nordeste (POMMER; MAIA, 2003). Os principais países de destino da uva

brasileira são: Países Baixos, Reino Unido, Alemanha, Bélgica, Canadá, Estados Unidos, Argentina e Uruguai. Quanto às cultivares exportadas, a uva 'Itália' destaca-se como a mais vendida, seguida pela 'Red Globe', 'Rubi' e 'Benitaka' (AMARO, 2002).

Atualmente, a apirenia é uma das características mais desejáveis para o mercado de uva *in natura*, uma vez que uvas sem sementes alcançam preços mais elevados que as uvas tradicionais com sementes. Em termos comerciais, as áreas plantadas são ainda insignificantes, quando comparadas às demais cultivares com sementes, entretanto, com perspectivas de expansão muito rápida, em virtude do grande número de vinhedos implantados com uvas sem sementes nos últimos anos, principalmente na região Nordeste (LEÃO, 2000).

O Brasil possui vantagens comparativas que, no caso da uva, se resumem na possibilidade de produção durante todo o ano, permitindo que o produto brasileiro possa ser exportado durante alguns meses, quase sem concorrência. Embora as uvas de mesa possam ser armazenadas por longos períodos, apresentam maiores dificuldades de conservação quando comparadas a outras frutas, devido à sua alta suscetibilidade à desidratação; aos danos mecânicos originados na colheita, manuseio ou transporte e; ao desenvolvimento de fungos causadores de podridões (MORALES, 1984; GONZALEZ et al., 2003). Se estes fatores de deterioração não forem bem controlados, o potencial de conservação diminui e as perdas tornam-se significativas (BENATO, 2002).

Nas condições de armazenamento requeridas pelas uvas de mesa, com alta e constante umidade relativa, assumem particular gravidade os prejuízos causados pelas podridões. O desenvolvimento de fungos durante o armazenamento e transporte é a maior causa de perdas pós-colheita (MARQUENIE et al., 2002), sendo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., agente causal do mofo cinzento, o de maior incidência (NELSON; AHMEDULLAH, 1976; BULIT; DUBOS, 1990; LICHTER et al., 2002; LYDAKIS; AKED, 2003b), podendo desenvolver-se, ainda que lentamente sob condições de baixa temperatura de armazenamento (ALVAREZ; VARGAS, 1983). Além deste patógeno, que é considerado o principal causador de doenças na pós-colheita, outros podem ocorrer como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus* sp., *Melanconium fuligineum*, *Lasiodiplodia theodromae* (syn. *Botryodiplodia*), *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e leveduras (PEARSON; GOHEEN, 1990; SNOWDON, 1990; BENATO et al., 1998; GONZALEZ et al., 2003).

Por melhor que seja o tratamento fitossanitário efetuado no campo, o mesmo não é suficiente para dispensá-lo na pós-colheita (ZOFFOLI et al., 1999). Por essa razão, o SO₂ geralmente é empregado no controle das podridões de pós-colheita de uvas de mesa combinado ao armazenamento sob baixas temperaturas (BULIT; DUBOS, 1990; SHOLBERG et al., 1996; ZOFFOLI et al., 1999; ZAHAVI et al., 2000). Porém, dependendo da cultivar, temperatura e umidade de armazenamento, entre outros fatores, o SO₂ pode apresentar diferenças quanto à eficiência e aos níveis de resíduo, cujo limite de tolerância é de 10 µg.g⁻¹ (FDA, 2003).

De acordo com Auger (1989), o maior problema em se utilizar o SO₂ como erradicante de *B. cinerea* é a proximidade entre as concentrações capazes de provocar toxicidade às uvas e as requeridas para o controle do patógeno. Altas concentrações de SO₂ podem causar danos aos cachos, como branqueamento e *flavor* desagradável (AL-BACHIR, 1998; ZAHAVI et al., 2000; LYDAKIS; AKED, 2003a).

Desde a década passada, a ênfase em proteção de frutos pós-colheita contra podridões tem sido desviada do uso de produtos químicos para várias técnicas alternativas de controle, que garantam a segurança do produto e não coloquem em risco a saúde das pessoas, como o uso de compostos naturais (SHOLBERG et al., 1996; ROMANAZZI et al., 2002) e tratamentos físicos (NIGRO et al., 1998), minimizando ou substituindo o uso de fungicidas e, prolongando o período de conservação dos frutos.

Uma nova estratégia para contornar este problema consiste no desenvolvimento de alternativas visando manter ou aumentar a resistência natural dos frutos (GONZALEZ et al., 2003), com a utilização de métodos de controle que possuam mecanismos que promovam a indução de resistência nos tecidos a microrganismos. A identificação de compostos de defesa naturais, envolvendo a síntese de fitoalexinas, tem sido descrito como um dos mecanismos mais importantes para a resistência de uvas, em resposta a infecções ou outros estresses como irradiação UV-C e produtos químicos (GONZALEZ et al., 2003). Muitas pesquisas vêm sendo divulgadas sobre os efeitos de agentes bióticos e abióticos aplicados em pós-colheita na indução de mecanismos de resistência em frutos colhidos, como por exemplo, *Candida saitoana* em maçã (CAPDEVILLE et al., 2002), quitosana e irradiação UV-C em uva (NIGRO et al., 1998; ROMANAZZI et al., 2002), entre outros. Inclusive,

encontram-se produtos em uso no comércio internacional que exploram os mecanismos de resistência da planta, dentre os quais temos o Oryzamate® (probenazole), Elexa® (quitina deacetilada), Bion® (acibenzolar S-metil ou BTH), Messenger® (harpina, uma proteína produzida por *Erwinia amylovora*) e Oxycom™, (mistura de nutrientes e ácido paracético); dentre estes o único que tem registro no Brasil é o Bion® (CARDOSO FILHO, 2003).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de agentes bióticos e abióticos, possíveis indutores de resistência, na proteção de cachos de uva 'Itália' pós-colheita, contra o mofo cinzento (*B. cinerea*) e, o efeito de controle dos agentes sobre o patógeno *in vitro*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão enfoca o uso de métodos alternativos no controle de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., com ênfase àqueles que são relatados como possíveis indutores de resistência em frutos pós-colheita, além dos aspectos relacionados à fisiologia e patologia pós-colheita de uvas de mesa.

4.1. Aspectos da pós-colheita de uvas de mesa (*Vitis vinifera*)

A uva é uma fruta não climatérica, com baixa taxa respiratória (5 a 10 mg CO₂.kg⁻¹.h⁻¹, à 5°C) e muito baixa produção de etileno (<0,1 µL.kg⁻¹.h⁻¹, à 20°C). Por apresentar baixa sensibilidade ao *chilling injury* (dano pelo frio), pode ser armazenada a 0°C e 95 % de umidade relativa por longo período (KADER, 1992). Assim como outras frutas não climatéricas, a uva não amadurece após ser colhida; por isso, recomenda-se a colheita ao atingir um estágio ótimo de consumo quanto à aparência, aroma, sabor e textura (HEDBERG, 1979; NELSON, 1984a; KANELIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993), que ocorre quando a maturação de colheita coincide com a maturação de consumo. As uvas alcançam o

limite de armazenamento, quando adquirem cor opaca, perdendo firmeza e tornando-se flácidas. Estas condições são resultantes de processos tais como respiração e transpiração, os quais são afetados pela temperatura e umidade relativa, maturidade da uva, cultivar e período de armazenamento (HEDBERG, 1979). Considerando a baixa taxa respiratória da uva, a perda de massa é definida principalmente pela desidratação dos cachos, sendo o mais importante processo fisiológico, em termos de qualidade, a afetar o período de armazenamento das uvas de mesa (CARVAJAL-MILLÁN et al., 2001).

O índice de maturação mais usado para definir o ponto de colheita das uvas é o conteúdo de sólidos solúveis (°Brix) das bagas (GORGATTI NETTO et al., 1993; KANELIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993), empregando-se para leitura um refratômetro manual. O mínimo requerido varia com a cultivar, região de cultivo e o destino da uva. Em normas internacionais de comercialização, o teor mínimo de sólidos solúveis para uvas de mesa pode variar de 14,0 a 17,5 °Brix, dependendo da cultivar e das condições de cultivo (NELSON, 1984a; ABARCA; LIZANA, 1987; KADER, 1992; GORGATTI NETTO et al., 1993; CARVAJAL-MILLÁN, et al., 2001). Na região do Vale do São Francisco, a concentração média, medida no campo, deve ser superior a 15 °Brix, enquanto que em São Miguel Arcanjo/SP, o teor de sólidos solúveis deve estar acima de 14 °Brix (GORGATTI NETTO et al., 1993). Resultados apresentados por Ruffner et al. (1976) confirmam a influência da temperatura de cultivo nos níveis de acidez e no teor de sólidos solúveis das bagas. Mas não é apenas a temperatura que afeta as características dos cachos, as chuvas e a irrigação também exercem grande influência, principalmente, na constituição química das bagas. O regulamento técnico de classificação brasileira para uvas finas de mesa (IN SARC/MAPA nº 001, de 01/02/2002), considera o mínimo de 14 °Brix, aferido pelo refratômetro. Recomenda-se para análise de sólidos solúveis que a amostra seja composta pelo suco de quatro bagas: uma da parte superior, duas da parte mediana e uma da parte inferior do cacho (MAPA, 2003). Este padrão de amostragem das bagas para análise da composição química da uva é adotado pelos exportadores chilenos (ASSOCIACION DE EXPORTADORES DE CHILE, 1997).

Glicose e frutose, que constituem 99 % ou mais dos açúcares presentes no suco da uva (RUFFNER, 1982) e de 12 a 27 % do peso da matéria fresca das

bagas maduras, representam uma grande proporção dos sólidos solúveis. Quanto à acidez, as uvas são constituídas principalmente dos ácidos málico e tartárico, perfazendo juntos um total de 90 % ou mais da acidez titulável (KANELLIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993).

Juntos, os açúcares e os ácidos são os mais importantes constituintes do sabor da fruta e a determinação da relação sólidos solúveis/acidez titulável (*ratio*) é que melhor define o grau de maturação das uvas. Durante o processo de maturação, o teor de sólidos solúveis aumenta e o de ácidos orgânicos diminui (CARVALHO; CHITARRA, 1984).

Nelson (1984a) cita que o padrão de qualidade da Califórnia estabelece que, com exceção das cultivares Thompson Seedless e Perlette, a uva pode ser considerada madura, quando o suco apresentar um teor de sólidos solúveis/acidez titulável igual ou superior a 20:1 (*ratio*). Assim também, de acordo com as normas chilenas, a cultivar que não apresentar o nível mínimo de sólidos solúveis na colheita, deve satisfazer ao *ratio* de 20:1 (ASSOCIACION DE EXPORTADORES DE CHILE, 1997). Esta relação se torna mais importante em cultivares com elevada acidez. Segundo Abarca e Lizana (1987), a aceitabilidade quanto ao sabor aumenta conforme aumenta o conteúdo de sólidos solúveis e a relação sólidos solúveis/acidez titulável. A norma brasileira não leva em consideração esta relação (*ratio*) para classificação das uvas finas de mesa (IN SARC/MAPA nº 001, de 01/02/2002) (MAPA, 2003).

Outros compostos químicos também são responsáveis por várias características da uva, cabendo ressaltar a importância dos ésteres voláteis, responsáveis pelo aroma característico da fruta; dos compostos fenólicos (taninos), responsáveis pela adstringência e, das antocianinas, que conferem cor às uvas tintas (KANELLIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993). O conteúdo de carotenóides diminui acentuadamente durante a maturação da uva, coincidindo com o período no qual os flavonóides são acumulados (RAZUNGLES et al., 1988).

A temperatura adequada para conservação pós-colheita da uva depende da cultivar e do período durante o qual se pretende conservá-la. Após passar por um processo de resfriamento rápido (3 a 4°C), visando a eliminação do calor de campo, a fruta é armazenada sob condições de temperatura na faixa de segurança de 1 a 3°C e de umidade relativa do ar de 95 % (CHOUDHRY, 2000). Há três razões para explicar porque as uvas de

mesa devem ser resfriadas rapidamente logo após a colheita: minimizar a perda de água, retardar o desenvolvimento de podridões e, reduzir a taxa respiratória; tudo isso visando manter a qualidade da fruta por mais tempo (NELSON, 1984b). László et al. (1981) verificaram um aumento nos danos causados por SO₂ (branqueamento) e da podridão causada por *Botrytis* em uvas onde o resfriamento foi atrasado.

Takeda et al. (1983) não verificaram mudanças nos valores de sólidos solúveis, acidez titulável e pH em uvas 'Muscadine' armazenadas a 20°, 4,5° ou 0°C. Mas, as doenças aumentaram rapidamente nas uvas mantidas sob temperatura mais alta.

As maiores perdas pós-colheita são devido à ocorrência de manchas, perda de água e deterioração, que determinam a vida pós-colheita e a forma de preservação das uvas de mesa (SNOWDON, 1990; KANELLIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993). Se os cachos forem manuseados incorretamente, perdem a proteção natural dada pela cera (pruína), presente na epiderme das bagas (SNOWDON, 1990). A espessura e a rigidez da epiderme são fatores que contribuem para a resistência das uvas de mesa aos danos causados pelo manuseio durante a colheita, embalagem, transporte e armazenamento (KANELLIS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993). É importante ressaltar que, embora não possuam mais estômatos quando maduras, a perda de água ocorre basicamente através das lenticelas presentes na epiderme das bagas e através da ráquis (ASSIS; LIMA FILHO, 2000). Se os cachos permanecerem em condições de alta temperatura e, principalmente, baixa umidade relativa, pode ocorrer a desidratação e o escurecimento da ráquis, isso contribui para reduzir a vida pós-colheita das uvas, pois, além de afetar a aparência dos cachos, a desidratação da ráquis favorece a degrana.

4.2 Aspectos do patógeno (*Botrytis cinerea*)

A doença pós-colheita causada por *B. cinerea* representa um dos fatores mais limitantes durante o armazenamento prolongado de frutas e hortaliças (EL GHOUTH et al., 1994). Considerado um fungo polífago, *B. cinerea* é patogênico a uma ampla gama de hospedeiros, incluindo frutas, hortaliças e plantas ornamentais (MAROIS; LUVISI, 1992; GHINI, 1996; REBORDINOS et al., 1996; JALIL et al., 1997; LEROUX et al., 1999; CHARDONNET et al., 2000; REDDY et al., 2000; BARALDI et al., 2002;

KELLER et al., 2003; GONZALEZ et al., 2003), nos quais causa perdas de importância econômica, não apenas no campo, mas também durante o transporte e armazenamento (ROSSLENBROICH; STUEBLER, 2000). Estudos epidemiológicos são difíceis devido à variabilidade genética dentro desta espécie (CHARDONNET et al., 2000). O fungo apresenta grande capacidade reprodutiva, fácil disseminação pelo vento, ampla adaptação térmica e secreta enzimas pectinolíticas que degradam as paredes celulares (JALIL et al., 1997). No campo, o fungo infecta principalmente os cachos, atacando folhas e outras partes com menor frequência (LANGCAKE, 1981). Dados de Holz et al. (2003) mostraram que *B. cinerea* ocorre predominantemente em cachos e está associado principalmente à base das bagas e ao pedicelo.

Em 1866, de Bary descobriu a conexão genética entre *B. cinerea* e o ascomiceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, sua fase teleomórfica (ROSSLENBROICH; STUEBLER, 2000). A doença provoca sérias reduções quantitativas e qualitativas sobre a produção de uvas, ocasionadas pela queda prematura dos cachos, devido ao apodrecimento do pedúnculo, ou pelo dano direto nos cachos, correspondente ao murchamento das bagas (KIMATI; GALLI, 1985; BULIT; DUBOS, 1990).

B. cinerea é o microrganismo de maior incidência em uvas de mesa na fase de pós-colheita (BULIT; DUBOS, 1990; DIAS et al, 1998; ZAHAVI et al., 2000; LICHTER et al., 2002; LYDAKIS; AKED, 2003b; GONZALEZ et al, 2003) e, geralmente se desenvolve à partir do inóculo presente internamente nas bagas infectadas durante o florescimento (LATORRE, 1984; SNOWDON, 1990; HANKE, 1997), causando perdas significativas, em todas as regiões produtoras do mundo. Pode ocorrer no campo e causar danos, mas em geral, é na fase de armazenamento que o patógeno é mais agressivo, o que o caracteriza como um grave problema para as uvas armazenadas. De acordo com González et al. (1993) e Tavares et al. (2000), em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, as perdas chegam a mais de 50 % nas cultivares mais suscetíveis, com cachos mais compactos, principalmente quando períodos prolongados de umidade antecedem a colheita.

Este fungo cresce em quase todas as faixas de temperatura em que a uva é manuseada, mas seu crescimento é reduzido à medida que a temperatura diminui (NELSON, 1984b). Assim, a agressividade deste patógeno se explica, porque não só sobrevive em temperaturas de 0°C, como também pode causar infecções nesta temperatura. Embora as

baixas temperaturas constituam um fator determinante na patogenicidade do fungo, sob tais condições, *B. cinerea* cresce com menor velocidade (JALIL et al., 1997; HANKE, 1997).

De acordo com o dicionário de fungos publicado em 1995, *B. cinerea* pertence aos fungos chamados de mitospóricos (HAWKSWORTH et al., 1995). Caracteriza-se por possuir conidióforos longos (1 a 3 mm), delgados, hialinos ou pigmentados, ramificados, com células terminais alargadas ou esféricas, de onde saem os cachos de conídios em um curto esterigma. Os conídios com dimensões de 10-12 μm de comprimento e 8-10 μm de largura são unicelulares, multinucleados, ovóides, globosos ou elípticos, lisos, hialinos ou levemente acinzentados, formando uma massa de coloração típica, acinzentada; o micélio, com hifas septadas, ramificadas, de coloração oliva amarronzado, com 11 a 23 μm de diâmetro pode penetrar diretamente através das células epidérmicas do tecido vegetal, sendo que anastomoses entre as hifas são freqüentemente observadas. A sobrevivência do patógeno ocorre com a formação de uma estrutura espessa, escura e discóide, com tamanho de 2-4 x 1-3 mm, chamada escleródio, formada por aglomeração de hifas; *B. cinerea* pode também produzir microconídios (2 a 3 μm de diâmetro) que são hialinos e unicelulares, formados em cadeias e embebidos em mucilagem (BARNETT; HUNTER, 1972; GALLOTTI; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1990; BULIT; DUBOS, 1990; HURTADO; MARTÍNEZ, 1996; CALDARI JÚNIOR, 1998; PAUL et al., 1998). Este fungo pode sobreviver parasiticamente, causando mofo cinzento, mas também saprofiticamente em tecido necrótico, senescente ou morto (BARNETT; HUNTER, 1972; BULIT; DUBOS, 1990; HURTADO; MARTÍNEZ, 1996; ROSSLENBROICH; STUEBLER, 2000; HOLZ et al., 2003). Em meio BDA (batata-dextrose-ágar), *B. cinerea* produz colônia espessa, cotonosa e de coloração acinzentada (PAUL et al., 1998).

Segundo Nelson (1956), o conídio de *B. cinerea* pode produzir mais de um tubo germinativo, de aproximadamente 150 μm de comprimento e, em seguida, o apressório é formado. O apressório produz um *peg* de infecção ou hifa infectiva que rompe a cutícula dos frutos de forma mecânica. Após a penetração, há crescimento lateral do micélio entre as 5-8 primeiras camadas de células mais externas da epiderme. As hifas produzem pectinases que degradam a pectina intercelular.

A epiderme das bagas é a principal proteção contra a infecção por *Botrytis*. Então, qualquer prática química ou cultural que altere as características da epiderme pode alterar a resistência da baga à infecção (MAROIS et al., 1992). Marois et al. (1987) verificaram que a aplicação de adjuvantes em bagas de uva aumentou significativamente a doença causada por *B. cinerea*, sugerindo que o possível mecanismo para o aumento do índice de doença seja a ruptura da camada de cera epicuticular, presente nas bagas.

O fungo produz no interior do órgão atacado hifas que, ao destruírem o tecido parasitado, exteriorizam-se produzindo conidióforos com conídios que inicialmente são brancos e aos poucos adquirem cor cinza que é típica da doença (PÉREZ MARIN, 1998).

A doença caracteriza-se por produzir manchas circulares arroxeadas nas bagas, nas quais, as células mortas e maceradas, posteriormente, tornam-se pardas em uvas brancas, sendo nas uvas tintas mais difíceis de se observar. Com a evolução dos sintomas, estas manchas ficam deprimidas e a ocorrência de abundante esporulação do fungo dá a aparência de mofo cinzento (LANGCAKE, 1981; KUHN; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1985; SNOWDON, 1990; MAROIS; LUVISI, 1992). A epiderme das bagas desprende-se deixando a polpa da uva exposta. Caso a umidade persista, o fungo afetará mais profundamente a polpa, emitindo seus órgãos de frutificação que podem cobrir total ou parcialmente as bagas (KUHN; GRIGOLETTI JÚNIOR 1985) (Apêndice 1). A doença também é denominada de *piel suelta* (LATORRE, 1984) ou *slip skin* (BULIT; DUBOS, 1990; SNOWDON, 1990; MAROIS et al., 1992), por ser característico o desprendimento da cutícula da baga infectada, deixando a polpa firme exposta (NELSON, 1956). A umidade atmosférica favorece o desenvolvimento de um mofo esbranquiçado, sem esporos (BULIT; DUBOS, 1990; SNOWDON, 1990). O fungo fica restrito às regiões do tecido vegetal que estão visivelmente doentes e imediatamente ao redor da lesão, situação característica de fungos necrotróficos (LANGCAKE, 1981).

O fungo pode infectar os cachos em três diferentes épocas: no florescimento, na pré e pós-colheita. A infecção durante o florescimento pode provocar o abortamento das flores, deixando os cachos muito soltos. *B. cinerea* penetra através de cicatrizes provocadas pela queda das peças florais ou por outros ferimentos e, permanece em estágio de quiescência até a maturação das bagas, quando o conteúdo de açúcares alcança de 10 a 12 % (MCCLELLAN; HEWITT, 1973; LATORRE, 1984; BULIT; DUBOS, 1990; SNOWDON, 1990; JARVIS, 1994; PRUSKY, 1996; ZAHAVI et al., 2000). Na pré e pós-

colheita, as bagas são muito suscetíveis e, o patógeno é disseminado pelo simples contato entre as bagas doentes com as sadias. Na pré-colheita, os insetos também contribuem para a dispersão do fungo (LATORRE, 1984). De acordo com Keller et al. (2003), as infecções quiescentes causadas por *B. cinerea* ficam restritas à área do receptáculo em bagas com tamanho de ervilha, mas na colheita atinge a baga inteira.

A resistência dos cachos à doença durante o estágio de quiescência ainda não é profundamente conhecida, mas pode estar ligada a mecanismos passivos de defesa, tais como a anatomia e a espessura da cutícula das bagas e sua composição química (antocianinas e compostos fenólicos) e; ativos como reações de suberização, presença de proantocianidinas que estão localizadas na casca das uvas, as quais inibem a ação de enzimas maceradoras produzidas pelo fungo e, produção de fitoalexinas com atividade antifúngica, que exercem um importante papel na resistência das uvas à infecção por *B. cinerea* (BULIT; DUBOS, 1990; PRUSKY, 1996; DIAS et al., 1998; GOETZ et al., 1999; COERTZE et al., 2001; HOLZ et al., 2003). O desenvolvimento lento e a inibição da penetração direta de *B. cinerea* em bagas de uva verdes indicam que estas apresentam resistência natural ao patógeno (PEZET et al., 1991; PÉREZ MARIN, 1998).

Com o avanço da maturação das uvas, ferimentos e aberturas naturais, ainda que favoreçam sua penetração não são considerados necessários, uma vez que o mecanismo de infecção mais característico do patógeno é a penetração direta das hifas ou conídios através da epiderme das bagas sadias (BASOALTO, 1979; BULIT; DUBOS, 1990; MAROIS et al., 1992; COMMÉNIL et al., 1997; PÉREZ MARIN, 1998; COMMÉNIL et al., 1999; COERTZE et al., 2001). Coertze et al. (2001) afirmam que embora outros autores considerem os estômatos e as microfissuras como sendo os sítios primários para penetração do patógeno, estudos com conídios isolados mostraram que estas não foram as principais portas de entrada para o patógeno, mas sim, diretamente.

A penetração direta é considerada ser devido à degradação enzimática da cutícula, particularmente por cutinases, proteinases e/ou poligalacturonases (REBORDINOS et al., 1996; COMMÉNIL et al., 1999). Além disso, a perda de turgescência das bagas, por efeito da desidratação relacionada com a baixa umidade relativa e a temperatura de armazenamento, significa uma menor pressão de turgor nas células cuticulares e,

conseqüentemente, estas resistem menos à pressão física exercida pelo patógeno ao forçar a penetração (MORALES, 1984; HANKE, 1997).

B. cinerea ocorre nos vinhedos na forma de escleródios, conídios e micélio, sendo os conídios responsáveis pela infecção primária (COERTZE et al., 2001). A sobrevivência do fungo se dá na forma de hifas, associadas a restos de cultura ou como escleródios (estruturas de resistência) formados em tecidos doentes. Sob condições favoráveis de umidade e temperatura, os escleródios germinam dando origem aos conidióforos que produzem grande quantidade de conídios, que são disseminados pelo vento, respingos de chuva ou por insetos para os brotos, flores ou cachos de uva (BASOALTO, 1979; LATORRE, 1984; COERTZE et al., 2001). Nos cachos imaturos os conídios permanecem quiescentes até a maturação, quando o fungo reassume o crescimento e dissemina-se rapidamente através das bagas (GALLOTTI; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1990; PÉREZ MARIN, 1998).

Sob condições favoráveis, durante o armazenamento da uva, o patógeno propaga-se de bagas infectadas para outras e, ocasionalmente, para outros cachos. Em cultivares de cachos muito compactos, as hifas do fungo passam facilmente de uma baga para outra, tomando rapidamente todo o cacho, causando aparência de “ninho” (BASOALTO, 1979; KUHN; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1985; BULIT; DUBOS, 1990). A dispersão do patógeno através das hifas de uma baga infectada para outra é conhecida como infecção de contato. Normalmente, os conídios não são tão importantes no ciclo da doença durante o armazenamento como são no campo (MAROIS; LUVISI, 1992).

Tanto a temperatura como a umidade relativa têm ação determinante sobre a germinação dos conídios e nos processos de infecção (BASOALTO, 1979). O período de tempo sob condições de alta umidade necessário para produzir infecção varia com a temperatura. Temperaturas elevadas normalmente aceleram o secamento das bagas e reduzem diretamente a germinação dos conídios (MAROIS et al., 1992). Uma informação importante é que os conídios de *B. cinerea* não germinam em ambiente com umidade relativa abaixo de 90 % (NELSON, 1951; THOMAS; MAROIS, 1988). Sob condições controladas, a velocidade do vento e a umidade relativa, fatores que influenciam diretamente no potencial evaporativo, foram importantes no desenvolvimento micelial e na produção de conídios de *B. cinerea* (THOMAS; MAROIS, 1988).

Os conídios germinam dentro de uma ampla faixa de temperatura que varia desde 1 até 33°C, ficando a ótima entre 20 e 23°C. Quando a temperatura atinge 35-38°C, os conídios de *B. cinerea* não germinam e, se a temperatura se mantiver nesse nível por mais de dois dias, os mesmos morrerão. A infecção ocorre após um período de 15 h numa faixa de temperatura ótima de 15 a 20°C, na presença de umidade relativa superior a 90 %; a 1,7°C, a infecção ocorre após 72 h (NELSON, 1951; WINKLER, 1970; BASOALTO, 1979; BULIT; DUBOS, 1990; CATALUÑA, 1991; JALIL et al., 1997). Os escleródios podem germinar a temperaturas variáveis de 3 a 27°C formando os conidióforos, que carregam em suas extremidades os conídios (BULIT; DUBOS, 1990; RIBEIRO, 2000).

As hifas também são capazes de desenvolver-se em baixas temperaturas. O crescimento micelial é nulo entre -1 e 0°C, com ótimo de 15 a 28°C. A temperatura mínima para ativação do crescimento micelial foi de 3,8 e 3,9°C e, as taxas de crescimento ótimas foram 0,437 cm².h⁻¹ a 20,5°C e 0,262 cm².h⁻¹ a 20,2°C, para *B. cinerea* de tomate e uva, respectivamente; sendo que a temperatura máxima inibitória para ambos os isolados foi de 35°C (JALIL, et al., 1997).

Moyano e Melgarejo (2002) investigando a sobrevivência de *B. cinerea* em solo esterelizado ou não, verificaram que os conídios sobreviveram por apenas sete dias à 40°C, mas, dependendo da umidade relativa, de 30 a 90 dias à 22°C.

Savage e Sall (1984) afirmam que *B. cinerea* desenvolve-se na ausência de água livre, protegido no interior do cacho, porém, a menor variação climática (temperatura e umidade) e radiação solar podem influenciar na habilidade e progresso do patógeno, daí a importância do manejo da cultura com podas, de modo a favorecer a radiação interna e a ventilação do parreiral.

Em 1996, Spotts e Holz verificaram que conídios de *B. cinerea* aderem mais fortemente nas bagas quando aplicados em suspensão aquosa ou na superfície úmida de bagas de uvas do que quando aplicados na superfície seca. Neste sentido, fermentos liberam suco celular no sítio de infecção, criando condições favoráveis para a hidratação dos conídios, o que pode aumentar a oportunidade de adesão e infecção pelo patógeno. Nestas condições, os conídios podem germinar em menos de 2 h (SPOTTS; CERVANTES, 2001).

Períodos menores que 15 min de água livre são suficientes para interromper a germinação dos conídios. Para germinar, os conídios de *B. cinerea* requerem

água livre e nutrientes, ao contrário do que se pensava, onde apenas umidade relativa elevada era suficiente para a germinação, sendo os açúcares simples, como frutose e glicose os mais importantes (MAROIS et al., 1992). Os açúcares presentes no exsudado de bagas maduras aumentam a germinação dos conídios, ao contrário do extrato de bagas imaturas, que inibe a germinação (MCCLELLAN; HEWITT, 1973; BASOALTO, 1979). McClellan e Hewitt (1973) mostraram que extratos aquosos obtidos do pólen, estigma e estilete estimularam a germinação e o crescimento do tubo germinativo de conídios de *B. cinerea*, enquanto o extrato do tecido de uvas no início do desenvolvimento teve efeito inibitório no crescimento do tubo germinativo.

Isso justifica o porquê de uvas colhidas no início da estação de colheita apresentarem, geralmente, menos podridão causada por *Botrytis* do que uvas colhidas mais tarde, onde a resistência ao patógeno pode estar associada ao conteúdo de açúcares e às chuvas próximas à colheita (WINKLER, 1970; MCCLELLAN; HEWITT, 1973).

O baixo pH das bagas verdes, determinado pela alta concentração de ácidos orgânicos, associado à presença de fitoalexinas, inibe a germinação e o crescimento do tubo germinativo de conídios de *B. cinerea*, fazendo com que bagas imaturas sejam altamente resistentes à penetração pelo patógeno (PEZET; PONT, 1988; KOCK; HOLZ, 1991). Isso constitui numa importante base para explicar a quiescência de *B. cinerea* em bagas de uva quando verdes.

A severidade da doença aumenta em anos quando ocorrem chuvas durante a estação de cultivo, especialmente próximo à colheita, mas, sérias perdas podem ocorrer sem umidade. De acordo com Winkler (1970), tempo chuvoso na época da colheita pode provocar perdas totais em cultivares muito sensíveis, em períodos não superiores a duas semanas. Nestas circunstâncias, a infecção por *Botrytis* em bagas de uva comumente ocorre em cultivares com parreiral denso ou cachos muito compactos (SAVAGE; SALL, 1983; GUBLER, 1987).

Além das condições ambientais, a severidade da doença está condicionada às cultivares, sendo as americanas mais resistentes do que as européias. Ainda, a compactidade dos cachos é importante, pois a água persiste muito tempo nas bagas e a penetração de fungicidas é dificultada, promovendo o desenvolvimento de podridões devido à formação de um microclima favorável (GALOTTI; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1990; VAIL;

MAROIS, 1991). As áreas das bagas que entram em contato umas com as outras, em cachos mais compactos, sofrem modificações na estrutura da camada de cera epicuticular e na cutícula, tornando-as mais suscetíveis à infecção. A função da cutícula e da cera epicuticular é de proteger os cachos contra a desidratação, embora, a cera epicuticular exerça também importante papel na resistência das bagas de uva à infecção por *B. cinerea* (MAROIS et al., 1986; ROSENQUIST; MORRISON, 1989; GALOTTI; GRIGOLETTI JÚNIOR, 1990; COMMÉNIL et al., 1997). Além disso, a compacidade dos cachos normalmente causa ruptura das bagas, favorecendo a entrada de microrganismos (MAROIS et al., 1986). Com a maturidade, as rachaduras na epiderme das bagas em cultivares mais suscetíveis à doença são mais freqüentes do que em bagas de cultivares menos suscetíveis, tornando-se porta de entrada para a penetração das hifas de *B. cinerea* (COMMÉNIL et al., 1997).

Snowdon (1990) e Agrios (1997) recomendam pulverizações com fungicidas durante o desenvolvimento dos cachos. Porém, afirmam que raças resistentes a muitos produtos têm surgido, indicando a combinação de diferentes fungicidas visando reduzir o surgimento e o estabelecimento de raças resistentes.

Freqüentes mutações, aneuploidia e heterocariose são as principais causas de variabilidade genética em *B. cinerea*, sendo as mutações a principal fonte de desenvolvimento de isolados ou raças resistentes a fungicidas (CHARDONNET et al., 2000; BARALDI et al., 2002). Além disso, variações de crescimento e esporulação podem ocorrer em diferentes raças e isolados do patógeno (CHARDONNET et al., 2000). Baraldi et al. (2002) afirmam que a pressão de seleção é exercida por diferentes práticas de manejo e pelo uso de diferentes fungicidas para o controle de *Botrytis* no vinhedo. Leroux et al. (1999) afirmam que a ação dos fungicidas sobre *B. cinerea* varia em função da raça do patógeno.

Deste modo, o controle da podridão em pós-colheita de uvas de mesa é indispensável, devido ao potencial de inóculo de *Botrytis* nos cachos colhidos, pela impossibilidade de erradicar o patógeno, e a capacidade do microrganismo continuar a se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 0°C (AUGER, 1989).

Na pós-colheita importantes medidas de controle incluem, manuseio cuidadoso, resfriamento imediato e rápido, uso de SO₂, tudo isso combinado com o armazenamento sob baixas temperaturas, próximas a 0°C. Porém, é importante ressaltar que, alternativas ao SO₂ são necessárias, principalmente devido ao sulfito ser alérgico para algumas

pessoas (LICHTER et al., 2002), estando sendo banido, ou restrito para uso em certos produtos, até mesmo em quantidades limitadas. O sulfito foi considerado causador de reações asmáticas em pessoas sensíveis. Ataques asmáticos são sérios e a ingestão de alimentos contendo sulfito foi considerada a causa de várias mortes na década de 80 (FAZIO; WARNER, 1990; FDA, 2003). Em uvas de mesa as preocupações por parte dos consumidores tornam-se crescentes sobre o resíduo de SO_2 no fruto fresco e sobre seu potencial fitotóxico (LYDAKIS; AKED, 2003a; ADASKAVEG et al., 2002). Justificando-se o fato de ter sido retirado pelo governo federal dos Estados Unidos da lista dos produtos considerados seguros (GRAS) como sanitizantes de frutas e hortaliças.

4.3 Indução de resistência

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI; LEITE, 1995; WURMS et al., 1999; STANGARLIN, 2002). A ativação de mecanismos de defesa endógenos tem sido vista como uma estratégia para a proteção de frutos colhidos (EL GHAOUTH et al., 2003a; EL GHAOUTH et al., 2003b).

Vários agentes podem induzir “sinais” no tecido vegetal que desencadeiam respostas de resistência sistêmica adquirida (RSA), promovendo uma proteção duradoura contra uma gama de fitopatógenos. Estes sinais promovem a ativação de mensageiros secundários como o ácido salicílico e jasmônico, levando à síntese subsequente de fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidases, proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e fitoalexinas (RESENDE, 2002; BENATO, 2003b).

Os frutos possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para a resistência dos mesmos contra patógenos (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A indução de resistência envolve a ativação desses mecanismos de defesa contra patógenos que permanecem quiescentes no tecido vegetal através do uso de agentes bióticos ou abióticos (COHEN, 1996; ROMEIRO, 1999; ROMEIRO, 2001). A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento desafiador). Essa dependência indica que mudanças no

metabolismo do fruto, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, são importantes para a resistência induzida (STANGARLIN, 2002).

Nas interações patógeno-hospedeiro, o patógeno utiliza substâncias químicas (enzimas, toxinas e hormônios) para atacar o hospedeiro que, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno. Embora os mecanismos bioquímicos e estruturais possam ser subdivididos em pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis), os últimos é que se mostram de interesse dentro do fenômeno de indução de resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Compostos pré-formados, presentes em plantas saudáveis que podem representar uma barreira química às infecções por patógenos em potencial, são chamados de compostos antimicrobianos pré-formados ou fitoantecipinas. Por outro lado, os compostos sintetizados em resposta ao ataque de patógenos ou estresse, como parte da resposta de defesa da planta, são chamados fitoalexinas (OSBOURN, 1999). Compostos antimicrobianos pré-formados ficam retidos dentro das células vegetais, na sua forma biologicamente ativa ou como precursores inativos os quais podem ser prontamente ativados em resposta ao ataque do patógeno (OSBOURN, 1999).

Dependendo da taxa de colonização pelo patógeno e da indução dos mecanismos de defesa, a planta hospedeira poderá exibir maior ou menor resistência (ESQUERRÉ-TUGAYÉ, 1987). Essa resistência às doenças, em muitos casos, é resultado da ativação de mais de um mecanismo de defesa, e está associada com compostos induzíveis que podem atuar contra microrganismos envolvendo, por exemplo, modificações da parede celular (deposição de lignina, extensina, suberina), síntese de peroxidases, produção de fitoalexinas, ativação de proteínas-RP e reação de hipersensibilidade (EBEL, 1986; MÉTRAUX et al., 1988; DALISAY; KUC, 1995b; ROMEIRO, 1999; HAMMERSCHMIDT, 1999; GOVRIN; LEVINE, 2000). Dentre estes, a reação de hipersensibilidade (RH) é considerada o principal elemento envolvido na resistência das plantas às doenças (DERCKEL et al., 1999, GOVRIN; LEVINE, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1994; EBEL, 1986; DARVILL; ALBERSHEIM, 1984). Este mecanismo de resistência consiste na morte rápida de poucas células ao redor do sítio de infecção e expressão de uma série de respostas de defesa para limitar o desenvolvimento do patógeno (DERCKEL et al., 1999). Embora a morte de células durante a RH seja uma estratégia de defesa das plantas, eficiente contra patógenos biotróficos, pode não

ser contra a infecção por patógenos necrotróficos como *B. cinerea*. Pelo contrário, *B. cinerea* dispara a reação de hipersensibilidade e se alimenta do tecido morto, o que facilita a rápida colonização do tecido vegetal. Dessa forma, este patógeno tem tirado proveito dos mecanismos de defesa do hospedeiro em favor de sua patogenicidade (GOVRIN; LEVINE, 2000).

A contribuição da lignificação, mecanismo de defesa estrutural pós-formado, na resistência pode ocorrer de diferentes maneiras. Em primeiro lugar, a incorporação de lignina junto à parede celular vegetal torna-a mais resistente à degradação por enzimas secretadas pelo patógeno invasor. Paredes celulares lignificadas podem constituir uma barreira, evitando o movimento de nutrientes até o patógeno. Os próprios precursores de lignina (Ex.: enzima fenilalanina amônia-liase) podem exercer um efeito tóxico sobre o patógeno ou conduzir à lignificação de estruturas do patógeno (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982).

A peroxidase não é um composto antifúngico, mas pode estar envolvida na resistência de plantas, gerando radicais livres e peróxido de hidrogênio que são tóxicos a vários microrganismos (DALISAY; KUC, 1995a; RIJ; FORNEY, 1995). Além dessa enzima, a indução da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave na via do ácido chiquímico que leva à síntese de fenóis, fitoalexinas e lignina, associados à resistência, mostra-se importante (EL GHAOUTH et al., 2003a). A atividade da FAL é alta durante os estádios iniciais de desenvolvimento das bagas de uva, seguida por um rápido declínio próximo à maturação. Em cultivares de epiderme colorida, a atividade da FAL é elevada no início da coloração das bagas, existindo correlação entre a atividade da enzima e a intensidade de cor (KANELLINS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993).

Dentre os mecanismos bioquímicos, podemos destacar ainda, as proteínas constitutivas das plantas ou relacionadas à patogênese (proteínas-RP), as quais são induzidas nos tecidos vegetais em resposta à infecção com patógenos, pelo tratamento com agentes bióticos e abióticos, ou outras situações de estresse, ou seja, através de reações de defesa (ROMEIRO, 1999; WURMS et al., 1999; NARUSAKA et al., 1999; GUZZO, 2003). Essas proteínas apresentam como característica a estabilidade em pH baixo (2,8) e altas temperaturas (60-70° C), resistência à ação de enzimas proteolíticas, estando localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto. Dentre estas proteínas encontram-se a quitinase e a β -

1,3-glucanase (REBORDINOS et al., 1996; DERCKEL et al., 1999), as quais são enzimas líticas que hidrolisam a quitina e as β -1,3-glucanas, respectivamente, resultando na geração de fragmentos de quitina e glucana que podem atuar como eliciadores não específicos de mecanismos de defesa das plantas (MÉTRAUX et al., 1988; LAWRENCE et al., 1996, WURMS et al., 1999). Essas hidrolases podem estar envolvidas no processo de defesa dos frutos contra fungos, uma vez que os polímeros citados são os principais constituintes da parede celular fúngica. As proteínas-RP podem também ocasionar a liberação de eliciadores de fitoalexinas, bem como induzir a síntese de compostos fenólicos (ROMEIRO, 1999). Por sua vez, plantas transgênicas que expressam genes de quitinase e β -1,3-glucanase parecem ser mais resistentes ao ataque por patógenos (PORAT et al., 1999). A quitinase pode ser parte dos mecanismos de defesa que são ativados pela infecção com patógenos necrotróficos. Quando presente no fluído intercelular, a quitinase pode entrar em contato com a quitina da parede celular do fungo e catalisar suas hidrólises, inibindo diretamente o crescimento do patógeno (MÉTRAUX et al., 1988).

Tendo em vista que a quitina não é constituinte da parede celular vegetal, é provável que quitinase exerça um importante papel na defesa contra patógenos. Um papel similar, inequívoco da β -1,3-glucanase não é claro, porque componentes da parede celular tanto dos patógenos como das plantas são substratos desta enzima (EBEL, 1986). Ainda não se sabe se os níveis constituintes destas enzimas são suficientes para suprimir o desenvolvimento de patógenos, porém, podem promover uma proteção satisfatória se combinadas a outras formas de defesa (WURMS et al., 1999). Em kiwi, embora a pesquisa indique que a quitinase pode exercer um importante papel na defesa contra *B. cinerea*, o baixo nível de indução e a lenta velocidade de resposta sugerem que este não é um mecanismo de defesa primário (WURMS et al., 1999).

Por sua vez, as fitoalexinas são compostos antimicrobianos que acumulam em decorrência da ação de fatores bióticos ou abióticos, pela presença de patógenos, por danos mecânicos ou por distúrbios fenológicos de diferentes naturezas (EBEL, 1986; PASCHOLATI; LEITE, 1994; PAUL et al., 1998; WURMS et al., 1999; MAGEE; SMITH, 2002), como por exemplo, congelamento, calor ou irradiação UV-C (Darvill & Albersheim, 1984). Moléculas que sinalizam a produção destes compostos foram isoladas de

vários fungos e denominadas como eliciadores (DARVILL; ALBERSHEIM, 1984; EBEL, 1986; PAUL et al., 1998). Muitas, mas nem todas as fitoalexinas são compostos fenólicos (NICHOLSON; WOOD, 2001), lipofílicos, de baixo peso molecular (WURMS et al., 1999; PASCHOLATI; LEITE, 1995). As fitoalexinas pertencem a diferentes classes químicas, que incluem fenóis do tipo flavonóide (pisatina, faseolina, gliceolina, luteolinidina e apigeninidina), poliacetilenos (wieronina) e isoprenos, incluindo terpenóides (rishitina e gossipol) e esteróides (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Esses compostos são sintetizados através de três caminhos metabólicos: acetato-mevalonato, acetato-malonato e acetato-shiquimato (PASCHOLATI; LEITE, 1995; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, 1987), podendo as plantas acumular quantidades suficientes para inibir o crescimento de patógenos (DARVILL; ALBERSHEIM, 1984). Se é conhecido que as plantas produzem várias fitoalexinas, a composição da mistura destes compostos pode depender do agente indutor e do órgão da planta desafiado; além disso, o tipo e a concentração do eliciador utilizado tem pronunciado efeito não só na extensão, mas também no tempo de manutenção da resposta induzida (EBEL, 1986). O local, a velocidade, e a intensidade na qual esses compostos são formados indicam a resistência da planta à infecção por patógenos (LANGCAKE, 1981; EBEL, 1986; PEZET et al., 1991; OSBOURN, 1999).

As fitoalexinas que ocorrem em uva, pertencem à família dos estilbenos e tem como maior constituinte o resveratrol (*trans* 3,5,4' trihidroxiestilbeno), que é sintetizado via enzima estilbeno sintetase; sendo que modificações em sua base molecular resultam na produção de pterostilbeno (*trans* 3, 5-dimetoxi-4' hidroxiestilbeno), e viniferinas (LANGCAKE, 1981; PEZET et al., 1991; BREUIL et al., 1998). *Trans*-resveratrol foi detectado pela primeira vez em vinhedo (*Vitis vinifera*) em 1976 por Langcake e Pryce, onde verificaram que o composto havia sido sintetizado pelo tecido foliar em resposta à infecção fúngica, principalmente *B. cinerea*, ou estresse ambiental (exposição à luz ultravioleta). Mais tarde, Pezet et al. (1991) afirmaram que estes compostos só eram produzidos em folhas e frutos após exposição a irradiação UV-C ou após a infecção por fungos. Em 2000, Palomino et al. confirmaram a presença de resveratrol em bagas de uva em resposta à infecção com fungos, principalmente *B. cinerea*, e estresse ambiental.

A análise de resveratrol no tecido da videira é usada como base para a seleção de cultivares de uvas resistentes ao fungo *B. cinerea*, por estar diretamente relacionada

com a resistência das cultivares (PEZET et al., 1991; DIAS et al., 1998; SBAGHI et al., 1996). Keller et al. (2003) verificaram que o acúmulo de resveratrol ocorreu principalmente após a inoculação de cachos de uva com *B. cinerea* no período de pré e pleno florescimento, porém não preveniu a infecção. A habilidade das flores de acumular estilbenos pode potencialmente reduzir as infecções primárias e quiescentes. Os autores sugerem que os estilbenos podem ter um papel limitado na inibição da infecção durante o florescimento e na quiescência em cultivares de uva suscetíveis.

Se a produção de fitoalexinas é importante para a resistência às doenças, é provável que um rápido acúmulo seja mais significativo (CREASY; COFFEE, 1988), sendo associado a reações de hipersensibilidade (ESQUERRÉ-TUGAYÉ, 1987). De acordo com Wurms et al. (1999), a indução de fitoalexinas representa um dos mais rápidos sistemas de ativação genética em plantas e, por isso pode ser importante nos estádios iniciais de infecção, na defesa localizada. A capacidade de síntese de estilbenos no tecido das plantas é geneticamente determinada, sendo que todos os membros da família *Vitaceae* são capazes de produzir estes compostos, mas as cultivares americanas e os híbridos interespecíficos, geralmente, apresentam maior capacidade de síntese do que as européias, que são mais suscetíveis ao patógeno *B. cinerea* (KELLER et al., 2003).

O potencial de produção de fitoalexinas pelas uvas diminui com o aumento no conteúdo de sólidos solúveis nas bagas, assim, o período em que as bagas são mais suscetíveis às doenças, coincide com o período de menor potencial de produção de fitoalexinas (CREASY; COFFEE, 1988).

As fitoalexinas são tóxicas a fungos e bactérias e, suas propriedades biocida e biostática têm sido demonstrada (EBEL, 1986; PALOMINO et al., 2000). A ação das fitoalexinas sobre fungos resulta em granulação citoplasmática, desorganização do conteúdo celular, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas. Esses efeitos refletem na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e, redução ou inibição do crescimento micelial (LO et al., 1996).

De modo geral, os níveis de resveratrol na epiderme de bagas de uva tratadas com fungicidas sistêmicos foi maior do que em bagas não tratadas, ainda, o conteúdo de resveratrol variou com a cultivar (MAGEE; SMITH, 2002). Além do caráter antifúngico, o resveratrol é conhecido por apresentar importantes propriedades antioxidantes, podendo

exercer efeito positivo na conservação de uvas durante o armazenamento, além da possibilidade de prevenção de doenças cardiovasculares em humanos através do consumo de vinhos tintos (FRÉMONT, 2000; PALOMINO et al., 2000; FELICIO et al., 2001). Conseqüentemente, a aplicação exógena ou o aumento endógeno desta substância pode reduzir as perdas em uvas de mesa. Neste sentido, experimentos foram conduzidos, onde a aplicação exógena de resveratrol em diferentes frutos manteve a qualidade pós-colheita (GONZALEZ et al., 2003). Em uvas, dez dias após o tratamento com $1,6 \cdot 10^{-4}$ M de resveratrol em água, notou-se diferença significativa entre cachos tratados, que mantiveram a qualidade, sem sinais de mofo cinzento (GONZALEZ et al., 2003). Frémont (2000) e Palomino et al. (2000) afirmam que esta fitoalexina está presente na epiderme das bagas de uva, mas não na polpa. Uvas verdes sintetizam grande quantidade de resveratrol, mas, com a maturidade esta capacidade diminui e as bagas tornam-se mais predispostas ao ataque de patógenos, especialmente *B. cinerea* (JEANDET et al., 1991; PRUSKY, 1996). Por sua vez, a fitoalexina pterostilbeno é considerada, em adição ao ácido glicólico, ser o fator mais importante na resistência de bagas de uvas imaturas ao fungo *B. cinerea*. O pterostilbeno na concentração de $5 \cdot 10^{-4}$ M foi altamente tóxico ao *B. cinerea*, inibindo completamente a germinação dos conídios. Porém, resveratrol não apresentou toxicidade quando testado na mesma concentração (PEZET et al., 1991). Questiona-se sobre a habilidade das fitoalexinas em contribuir na resistência ao ataque de *B. cinerea*, uma vez que este patógeno é capaz de secretar enzimas capazes de detoxificar resveratrol em uva. Dessa maneira, outros mecanismos de defesa, tais como quitinase e β -1,3-glucanase, podem ser ativados em adição às fitoalexinas (DERCKEL et al., 1999).

A patogenicidade de *B. cinerea* está intimamente ligada à sua capacidade de metabolizar compostos antifúngicos presentes na uva (OSBOURN, 1999; GONZALEZ et al., 2003); através da produção de enzimas líticas, como estilbeno oxidase (BREUIL, 1998), que detoxificam as fitoalexinas resveratrol e pterostilbeno nas bagas de uva (PEZET, et al., 1991; SBAGHI et al., 1996; PEZET, 1998; KELLER et al., 2003), destruindo os mecanismos de defesa e permitindo que o fungo se desenvolva. Porém, estudos mostram que alguns compostos fenólicos presentes nas bagas de uva, inibem a atividade da enzima estilbeno oxidase (SBAGHI et al., 1996; GOETZ et al., 1999). Estudos *in vivo* mostraram a máxima produção de resveratrol um a dois dias após a infecção por *B. cinerea*, seguida por um

rápido decréscimo, provavelmente devido à capacidade do fungo de metabolizar o composto (GONZALEZ et al., 2003; KELLER et al., 2003). Oito isolados de *B. cinerea* cultivados sob as mesmas condições mostraram diferentes habilidades de degradar as fitoalexinas resveratrol e pterostilbeno de uva; assim, a patogenicidade dos isolados foi associada com sua capacidade de degradar estas fitoalexinas *in vitro*, sendo que isolados inábeis em degradar as fitoalexinas não foram considerados virulentos (SBAGHI et al., 1996).

A resistência de frutos e hortaliças a doenças pós-colheita está intimamente relacionada ao seu estado de maturidade e às mudanças fisiológicas associadas ao tecido senescente. Muitos compostos antifúngicos, ativos em frutos imaturos que diminuem com a maturação, podem em muitos casos, alterar a resistência dos frutos durante o armazenamento prolongado, sob condições de atmosfera controlada (BARKAI-GOLAN, 1990).

Quando as plantas, após serem expostas a agentes bióticos ou abióticos, possíveis indutores de resistência, ficam protegidas contra patógenos, não se pode supor simplesmente que ocorreu indução de resistência. Afinal, o agente de controle tanto pode estar induzindo resistência como atuando diretamente sobre o patógeno ou até atuando das duas maneiras ao mesmo tempo (ROMEIRO, 1999).

A expressão da indução não é imediata, para a planta expressar a resistência induzida, pode demorar de alguns dias a uma semana. Se a redução de incidência e/ou severidade for imediata, outros mecanismos podem ser os responsáveis (ROMEIRO, 1999).

Ativadores químicos de defesas das plantas, entendidos e visualizados como indutores de resistência, começam, inclusive, a constituir uma nova classe de pesticidas. Estes têm sido chamados de “fungicidas de quarta geração”, por terem modo de ação completamente diferente dos pesticidas até agora desenvolvidos, visto que não exibem efeito direto sobre os patógenos, mas ativam mecanismos de defesa das plantas, tornando-as mais resistentes (ROMEIRO, 1999).

É importante ressaltar que, a atividade do agente indutor não é devida à ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes antimicrobianos, mas sim à sua capacidade de sensibilizar a planta e, esta, ativar seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos em resposta à presença de um patógeno em potencial (MORAES, 1998;

PASCHOLATI, 2002). De acordo com Prusky e Keen (1993), um dos pontos mais importantes a ser levado em consideração é a toxicidade potencial destes compostos induzidos no tecido vegetal aos animais e ao homem. Os autores sugerem que uma situação ótima seria a indução de altos níveis de compostos antifúngicos por um período de tempo limitado, enquanto os frutos estão sob o risco de serem atacados pelos patógenos, com declínio destes níveis antes do produto ser consumido.

È bastante provável que a indução de resistência se torne um componente importante dos programas de manejo de doenças, particularmente nos casos onde os métodos atuais de controle mostram-se pouco efetivos. Obviamente, um dos resultados desta recente tecnologia deverá envolver a diminuição no uso dos pesticidas tradicionais, o que vem ao encontro com a preocupação mundial no tocante à preservação do meio ambiente e redução da poluição, além da minimização dos riscos à saúde humana (PASCHOLATI, 2002).

4.4 Agentes bióticos e abióticos

A literatura traz referência sobre vários agentes bióticos e abióticos indutores de resistência nos tecidos vegetais, inclusive em frutos após a colheita. Porém, esta revisão restringiu-se aos agentes que foram estudados nesta pesquisa.

4.4.1 Agentes bióticos

4.4.1.1 *Lentinula edodes*

Comumente conhecido como “Shiitake”, é o segundo cogumelo mais consumido no mundo, perdendo apenas para o *Agaricus bisporus* (BREENE, 1990). Esse basidiocarpo, cujo corpo de frutificação é amplamente utilizado na culinária asiática, vem sendo difundido atualmente a nível mundial, incluindo o Brasil (PASCHOLATI et al., 1998). O cogumelo pode ser cultivado em troncos de árvores como o eucalipto (Apêndice 2), carvalho, mangueira e abacateiro, ou em cultivo axênico, e tem atraído a atenção de pesquisadores por apresentar qualidades nutricionais, medicinais e terapêuticas comprovadas

cientificamente. Este cogumelo contém proteínas, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas e minerais (BREENE, 1990). Existem trabalhos que mencionam compostos oriundos de *L. edodes* com ação sobre patógenos de plantas e animais.

Piccinin (2000) demonstrou que o filtrado do píleo de *L. edodes* possui efeito bacteriostático, enquanto que o filtrado da estipe e do crescimento micelial foram bactericidas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, quando incorporados em água e não aquecidos. O aquecimento prévio do filtrado de píleo provocou uma perda total na sua atividade, enquanto o filtrado da estipe tornou-se bacteriostático após o aquecimento. Ishikawa et al. (2001) também verificaram o efeito bacteriostático de 35 isolados de *L. edodes* no crescimento de *Bacillus subtilis*, esta bactéria foi escolhida como indicadora através de testes preliminares. O efeito bacteriostático foi determinado pela formação de halo de inibição; neste caso, o aquecimento do filtrado a 100°C por 10 min não causou perda da atividade antibacteriana contra *B. subtilis* (ISHIKAWA et al., 2001).

O lixiviado de crescimento micelial de *L. edodes* obtido por Pacumbaba et al. (1999), inibiu o crescimento *in vitro* de todas as espécies de bactérias fitopatogênicas testadas, incluindo *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *X. campestris* pv. *glycines*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Ralstonia solanacearum* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, bem como inibiu o crescimento de bactérias que afetam alimentos ou animais: *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Bianco (1981) obteve atividade antibiótica contra *S. aureus* e *B. subtilis* utilizando cortinelina, um composto isolado de *L. edodes*.

No tocante ao efeito sobre fungos fitopatogênicos, os extratos obtidos a partir do crescimento micelial de *L. edodes*, incorporados em BDA a 100, 200 e 300 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, inibiram o desenvolvimento *in vitro* dos fungos *Helminthosporium* sp. e *Fusarium solani*, agentes causais da helmintosporiose do trigo e da síndrome da morte súbita em soja, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre as concentrações utilizadas. Por sua vez, o agente causal da seca das hastes e das vagens em soja, *Phomopsis sojae*, teve o seu crescimento micelial inibido apenas pela maior concentração utilizada (SASAKI, 1997).

Piccinin (2000) mostrou que o filtrado obtido a partir do crescimento vegetativo de *L. edodes*, bem como os extratos obtidos a partir do píleo e da estipe do

cogumelo, reduziram significativamente o crescimento micelial de *Exserohilum turcicum* e *Colletotrichum sublineolum* a partir da concentração de 1 % (v/v) no meio de cultivo. A 2 %, as preparações reduziram a esporulação dos patógenos. A atividade dos filtrados sobre o desenvolvimento micelial foi fungistática e termolábil.

Di Piero (2003) verificou que *L. edodes* reduz em mais de 50 % a severidade da antracnose causada por *Colletotrichum lagenarium*, em plantas de pepino mantidas em casa-de-vegetação, quando filtrados de basidiocarpo a 20 % foram aplicados no hospedeiro, além de induzir acúmulo local e sistêmico de peroxidase e quitinase, mas não de β -1,3-glucanase. Este mesmo autor obteve uma purificação parcial de eliciadores presentes no basidiocarpo de *L. edodes*, através do fracionamento com sulfato de amônio. Preparações obtidas a partir de *L. edodes* reduziram o número de lesões causadas pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV) em meias-folhas de fumo e ocasionaram inibição total do crescimento da bactéria *X. campestris* pv. *passiflorae*, *in vitro*; quando os filtrados foram autoclavados a atividade inibitória da multiplicação da bactéria foi completamente perdida (TONUCCI; PASCHOLATI, 2003).

4.4.1.2 *Agaricus blazei*

Conhecido como “Cogumelo-do-Sol” (Apêndice 3), no Brasil sua produção é crescente devido à demanda do mercado em função de suas propriedades medicinais (PASCHOLATI et al., 1998). Estudos realizados no exterior apontaram para uma possível substância constituída de polissacarídeos de ligação β -glicosídica associada a determinadas proteínas e denominada de complexo glucano-proteico, que possui uma forte atividade antitumoral (WASSER; WEIS, 1999). Embora possua moléculas com atividade biológica já demonstrada sobre tecidos animais, as pesquisas envolvendo o *A. blazei* e o seu possível uso fitopatológico estão se iniciando. Constatou-se que filtrados de *A. blazei* provocaram redução de 80 % na incidência da doença causada pelo vírus do endurecimento dos frutos (PWV) em maracujazeiro, no entanto, notou-se apenas proteção local, provavelmente substâncias antivirais produzidas pelo cogumelo afetaram a infectividade do PWV (DI PIERO; PASCHOLATI, 2002).

Extratos de *A. blazei*, em diferentes concentrações, com um intervalo entre a aplicação e a inoculação de quatro dias, mostrou apenas um efeito local na redução da severidade da antracnose em pepino (DI PIERO, 2003).

Em 2001 e 2002, Fiori et al. verificaram o efeito positivo do extrato bruto de *L. edodes* na inibição da germinação de esporos de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Entretanto, o extrato bruto obtido a partir de *A. blazei* não inibiu a germinação de esporos de *Bipolaris sorokiniana*; porém, ambos os extratos foram capazes de induzir o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja.

No caso de infecções quiescentes, como a causada por *B. cinerea*, onde o inóculo provém do período pré-colheita, antes que um tratamento pós-colheita possa ser aplicado (KOOMEN; JEFFRIES, 1993), microrganismos antagonistas podem ser promissores como “fungicidas vivos” no controle desta e de outras doenças que ocorrem em frutos colhidos (WILSON et al., 1991).

4.4.2 Agentes abióticos

4.4.2.1 Quitosana

A atividade antimicrobiana de substâncias naturais bioativas como a quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de microrganismos, tais como, bactérias, leveduras e fungos tem recebido considerável atenção nos últimos anos (SHAHIDI et al., 1999), devido aos problemas associados a produtos químicos, incluindo o desenvolvimento de resistência ao consumo por parte das pessoas a produtos tratados com fungicidas e o aumento no número de patógenos tolerantes a fungicidas na pós-colheita (SHAHIDI et al., 1999).

Quitosana, um polissacarídeo catiônico de alto peso molecular, é a forma desacetilada da quitina; é solúvel em ácidos orgânicos podendo ser usada como um revestimento para frutos (KENDRA et al., 1989; ZHANG; QUANTICK, 1997; ARVANITOYANNIS et al., 1998; SHAHIDI et al., 1999; ROLLER; COVILL, 1999; JIANG; LI, 2001). Juntamente com outros polissacarídeos e proteínas, está presente na parede celular de vários fungos (especialmente *Zygomycetos*) (KENDRA et al., 1989; ROLLER; COVILL,

1999; REDDY et al., 2000; BITTELLI et al., 2001). Existem variações quanto à eficiência antimicrobiana da quitosana; estas variações foram sugeridas ser devido à existência de diferentes graus de acetilação e peso médio molecular da quitosana; quitosana com grau de acetilação de 7,5 % foi mais efetiva no controle de bactérias do que quitosana com grau de acetilação de 15 % (ARVANITOYANNIS et al., 1998; SHAHIDI et al., 1999).

Atualmente, o produto comercial Elexa[®], tem como ingrediente ativo a quitosana, derivada de crustáceos (casca de caranguejo, camarão ou lagosta) (BENATO, 2003b). Estas cascas são um subproduto do processamento de frutos do mar; por este motivo, a matéria-prima para a produção de quitosana é abundante (BITTELLI et al., 2001).

O tratamento de frutos com quitosana tem se mostrado promissor no controle de doenças em pós-colheita (EL GHAOUTH et al., 1997; JIANG; LI, 2001), por apresentar atividade antifúngica contra vários patógenos, inclusive *B. cinerea* (HIRANO; NAGAO, 1989; EL GHAOUTH et al., 1991a; REDDY et al., 2000; ROMANAZZI et al., 2002; BAUTISTA-BAÑOS, 2003; ROMANAZZI et al., 2003).

A quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no crescimento do patógeno e ativando várias respostas de defesa no tecido vegetal (EL GHAOUTH et al., 1992a; EL GHAOUTH et al., 1994; AGRAWAL et al., 2002). Quanto às propriedades fungistática e fungicida contra patógenos de vários frutos e hortaliças (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003), a quitosana possui diferentes mecanismos de ação que incluem o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação, indução da síntese de calose (EL GHAOUTH et al., 1992a; EL GHAOUTH et al., 1994), eliciação da produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (EL GHAOUTH et al., 1991a; AGRAWAL et al., 2002). Ainda, a quitosana pode induzir a atividade da FAL (KENDRA et al., 1989; ROMANAZZI et al., 2002; KHAN et al., 2003). Devido à sua habilidade de formar um filme semi-permeável, pode modificar a atmosfera interna e diminuir as perdas por transpiração e desidratação dos frutos (EL GHAOUTH et al., 1991a; ZHANG; QUANTICK, 1997; REDDY et al., 2000; JIANG; LI, 2001), além de atrasar o amadurecimento e o escurecimento enzimático de alguns frutos como lichia (EL GHAOUTH et al., 1992b; ZHANG; QUANTICK, 1997; JIANG; LI, 2001; PEN; JIANG, 2003).

O efeito da aplicação de um filme de quitosana no escurecimento enzimático de lichia foi estudado por Zhang e Quantick (1997) que verificaram que a quitosana atrasa as mudanças no conteúdo de antocianinas, flavonóides e fenólicos totais, além de inibir o aumento na atividade das enzimas polifenol oxidase e peroxidase.

Testes realizados com animais domésticos demonstraram que a quitosana é um produto atóxico e biologicamente seguro (EL GHAOUTH et al., 1991a; ZHANG; QUANTICK, 1997). De acordo com Roller e Covill (1999), a inibição do crescimento e inativação de fungos e bactérias, respectivamente, foi dependente da concentração, do pH e da temperatura. Os mesmos autores concluíram que a quitosana pode ser uma alternativa viável para estudos sobre preservantes naturais de alimentos, predispostos ao ataque de fungos.

A expressão de barreiras estruturais pelo tecido do hospedeiro após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno invasor, bem como atrasar a retomada de desenvolvimento de infecções quiescentes (EL GHAOUTH et al., 1994). Em geral, muitas doenças pós-colheita originam de infecções quiescentes que se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos (EL GHAOUTH et al., 1994).

Estudos demonstraram que a aplicação de quitosana (1,0 ou 1,5 %) reduziu significativamente a podridão de *B. cinerea* em morangos armazenados por 21 dias a 13°C sem diferença significativa entre os tratamentos com quitosana e com o fungicida iprodione; 11 %, 10 % e 13 % de doença, respectivamente, contra 52 % na testemunha. Além de induzir a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase, o tratamento com quitosana manteve os frutos mais firmes e diminuiu a taxa de respiração dos mesmos durante o armazenamento por 21 dias a 4°C (EL GHAOUTH et al., 1991a).

El Ghaouth et al. (1992a) verificaram sinais de infecção causada por *B. cinerea* e *R. stolonifer* em morangos tratados com quitosana após cinco dias de armazenamento a 13°C comparado com um dia no tratamento testemunha. Após 14 dias de armazenamento, quitosana na concentração de 15 mg.mL⁻¹ reduziu a doença em morangos causada por ambos os fungos, ao redor de 60 % ou mais, e ainda, frutos tratados com quitosana maturaram normalmente sem qualquer sinal aparente de fitotoxicidade.

Ainda em morangos, a pulverização das plantas com a concentração de 6 g.L^{-1} de quitosana, duas vezes com intervalo de 10 dias, protegeu os frutos do mofo cinzento em pós-colheita e reduziu a taxa de senescência, mantendo a qualidade dos frutos a um nível aceitável durante quatro semanas de armazenamento a 3°C (REDDY et al., 2000). Além disso, os tratamentos com quitosana mantiveram os frutos mais firmes e a taxa de desenvolvimento de antocianinas foi menor. Os autores sugerem que o controle da doença pode ser atribuído à propriedade fungistática da quitosana e sua habilidade em induzir enzimas de defesa e fitoalexinas nas plantas, ou ainda, a combinação desses fatores (REDDY et al., 2000).

Cerejas imersas em 1,0 % de quitosana tiveram a ocorrência de doenças reduzida significativamente (ROMANAZZI et al., 2003). A aplicação de quitosana reduziu a taxa respiratória e a perda de massa de pitomba e inibiu a atividade da enzima polifenoloxidase, responsável pelas mudanças de cor dos frutos (JIANG; LI, 2001). Comparado com o controle, os frutos tratados com 2 % de quitosana permaneceram com cor brilhante e cerca de 95 % dos frutos tratados não apodreceram até 30 dias de armazenamento (JIANG; LI, 2001).

Bautista-Baños et al. (2003) obtiveram controle do fungo *C. gloeosporioides*, causador da antracnose em mamão, tanto *in vitro* como *in vivo*. Nos frutos, a aplicação de solução de quitosana a 1,5 % antes da inoculação, reduziu significativamente a doença, porém, quando os frutos foram inoculados antes do tratamento nenhuma diferença significativa foi observada e, a incidência foi alta em todos os tratamento (acima de 95%). *In vitro*, quitosana acima de 2,5 % inibiu completamente o crescimento micelial do patógeno e a 1,5 % causou alterações morfológicas nos conídios do fungo.

A pulverização de plantas de pepino com solução de quitosana 1, 4 ou 24 h antes da inoculação com *B. cinerea*, reduziu a incidência do mofo cinzento em 65 %, 82 % e 87 %, respectivamente. Entretanto, a pulverização de quitosana nas folhas 1 h após a inoculação com o patógeno, diminuiu apenas 52 % do mofo cinzento (BEN-SHALOM et al., 2003). Os autores concluíram que, embora um duplo modo de ação esteja envolvido no controle do mofo cinzento com quitosana, a atividade antifúngica do composto foi o fator essencial no controle da doença. Estes resultados sugerem que, uma vez estabelecido no tecido, o controle do patógeno com quitosana se torna mais difícil.

Em pimentão, quitosana (1 g.L^{-1}) reduziu a transpiração das plantas através do fechamento total ou parcial dos estômatos, conseqüentemente gerando uma economia de 26-43 % no uso da água pelas plantas, sem alterar a produção de biomassa e de frutos pelas plantas tratadas (BITTELLI et al., 2001). O tratamento com quitosana restringiu a proliferação de *B. cinerea* no tecido de pimentões e reduziu consideravelmente a maceração de componentes da parede celular do hospedeiro, especialmente, pectina e celulose. Além disso, quitosana causou vários danos às hifas invasoras de *B. cinerea* e interferiu na capacidade do patógeno de secretar poligalacturonase (EL GHAOUTH et al., 1997). A quitosana induziu o acúmulo da fitoalexina pisatina no endocarpo de ervilha 24 h após o tratamento (KENDRA et al., 1989).

O aumento na concentração de quitosana de 1,0 para 1,5 % resultou em menor perda de massa e cor, menor taxa respiratória, enrugamento e ataque de fungos, especificamente *B. cinerea*, *Erwinia* e *Alternaria* em pimentões e pepinos mantidos a 13 e 20°C (EL GHAOUTH et al., 1991b).

Romanazzi et al. (2002) obtiveram redução significativa do mofo cinzento em uva 'Itália' tratada com solução de quitosana (1 %) na pós-colheita, tanto em uvas armazenadas sob temperatura ambiente ($\pm 22^\circ\text{C}$) como em uvas mantidas sob refrigeração ($\pm 0^\circ\text{C}$). A aplicação de quitosana na pré-colheita, em todas as concentrações testadas (1,0; 0,5 e 0,1 %) reduziu significativamente o mofo cinzento na pós-colheita. A atividade da FAL na epiderme das bagas de uva 24 ou 48 h após o tratamento com quitosana a 1,0 % foi duas vezes maior do que nas bagas não tratadas. Assim, o efeito inibitório da quitosana parece originar da combinação da propriedade antifúngica e sua habilidade de estimular respostas de defesa nas bagas de uva.

Estudos realizados por El Ghaouth et al. (1991a; 1991b; 1992b), Du et al. (1997), Jiang e Li (2001) e Romanazzi et al. (2002) indicam que a quitosana tem potencial para prolongar o período de armazenamento e controlar doenças de morangos, pepinos, pimentões, tomates, pêssegos, pêras, kiwis, pitomba, uva, etc. Estes resultados podem ser atribuídos à redução na taxa respiratória, inibição no desenvolvimento de patógenos e atraso no amadurecimento devido à redução na produção de etileno e dióxido de carbono (EL GHAOUTH et al., 1991a; EL GHAOUTH et al., 1991b).

O uso de filmes e coberturas comestíveis para estender o período de conservação e manter a qualidade de frutos frescos, congelados ou processados, tem sido evidenciado durante os últimos anos, devido a sua natureza biodegradável e segura, comparado com o sulfito (SHAHIDI et al., 1999). Estes filmes externos têm sido um meio suplementar e algumas vezes essencial para o controle de mudanças fisiológicas, morfológicas e físico-químicas em alguns produtos (SHAHIDI et al., 1999). Neste sentido, a quitosana, por ser um produto comestível, tem potencial para servir como um material de cobertura antifúngico para frutos na pós-colheita (EL GHAOUTH et al., 1992a). O filme formado pela quitosana é resistente, flexível e muito difícil de ser rompido. Muitas destas propriedades mecânicas são comparáveis às apresentadas por polímeros comerciais de resistência média (BUTLER et al., 1996).

4.4.2.2 Ácido Acético

A fumigação de frutos visando o controle de doenças pós-colheita não é uma técnica amplamente utilizada, embora tenha algumas propriedades úteis. Os fumigantes podem difundir-se e penetrar em espaços protegidos que são inacessíveis aos pesticidas líquidos ou sólidos e, exercer seu efeito durante o período de exposição, mas, por serem difusíveis, deixam pouco ou nenhum resíduo, necessitando de constantes ou sucessivas aplicações. A fumigação para prevenção de doenças pós-colheita é comercialmente empregada em uvas de mesa, com dióxido de enxofre (SO₂).

No contexto dos fumigantes com possibilidade de utilização em pós-colheita, o acetaldeído (CH₃COH), um componente presente em baixíssimas concentrações no aroma natural de quase todos os frutos (PESIS, 1989; AVISSAR et al., 1990), tem sido considerado uma possível alternativa ao SO₂ para controle de doenças em uvas pós-colheita. O apodrecimento de framboesas, inoculadas com *B. cinerea*, foi controlado pela fumigação com vapor de acetaldeído, onde os tratamentos com 0,25 ou 0,5 % de vapor de acetaldeído por 70 min foram tão ou mais eficientes que o tratamento com 1 % (PRASAD; STADELBACHER, 1973). Os mesmos autores, em trabalho realizado em 1974, verificaram a mesma tendência, uma vez que, o tratamento de morangos com 1 % de acetaldeído por 30 ou 60 min foi tão eficiente quanto os tratamentos com concentrações maiores (4 %) no controle de *B. cinerea* e

R. stolonifer. Além de biocida, o vapor de acetaldeído pode exercer efeito sobre a maturação dos frutos. Pesis (1989) observou que uvas ‘Perlette’ e ‘Sultanina’ colhidas com baixo teor de sólidos solúveis (13,5 a 14,0 °Brix) e alta acidez titulável (1,33 a 1,37 %), quando tratadas com 0,7 a 0,9 % de acetaldeído, tiveram aumento significativo do teor de sólidos solúveis e redução da acidez. O mesmo não foi observado quando os cachos foram colhidos com alto teor de sólidos solúveis e baixa acidez, os quais não responderam ao tratamento com acetaldeído. Entretanto, na cultivar Sultanina sintomas de danos fisiológicos provocados pelo acetaldeído foram caracterizados pelo bronzeamento das bagas, além de sabor e aroma desagradáveis. De acordo com Sholberg et al. (2001), a cautela no emprego de acetaldeído em experimentos em armazenamentos comerciais provavelmente se deva às propriedades carcinogênicas e por ser um produto inflamável.

Por sua vez, o ácido acético (CH_3COOH), um intermediário metabólico universal que ocorre naturalmente em muitos frutos (MOYLS et al., 1996), em baixas concentrações não é inflamável, explosivo ou carcinogênico (SHOLBERG et al., 2001). Sendo um composto estável utilizado em grande quantidade em inúmeros processos industriais, pode ser promissor quando empregado na forma de vapor, para o controle de patógenos na pós-colheita (SHOLBERG; GAUNCE, 1996). Estudos prévios (SHOLBERG; GAUNCE, 1995; SHOLBERG; GAUNCE, 1996; SHOLBERG et al., 1996), mostraram que o vapor de ácido acético pode matar os esporos de vários fungos patogênicos presentes na superfície dos frutos. Sholberg e Gaunce (1995) constataram que o vapor de ácido acético é muito mais tóxico do que o vapor de acetaldeído para conídios de *B. cinerea*.

Sholberg e Gaunce (1995) demonstraram que a aplicação de baixas concentrações de vapor de ácido acético (2,7 a 5,4 mg.L^{-1}) em pós-colheita foram extremamente efetivas para o controle de *B. cinerea* e *P. expansum* em maçãs, sem induzir fitotoxicidade.

Maçãs contaminadas naturalmente com *Penicillium* spp., armazenadas a 1°C e tratadas com vapor de ácido acético, tiveram 50 % menos doença do que os frutos testemunha. Ainda, a vaporização com ácido acético foi tão efetiva quanto o fungicida thiabendazole em reduzir a doença, sem afetar a qualidade das maçãs (SHOLBERG et al., 2001). De acordo com os autores, o vapor de ácido acético apresenta grande potencial para reduzir as doenças em maçãs armazenadas, podendo ser usado como uma alternativa orgânica

aos fungicidas sintéticos para controle de *Penicillium* spp. Além do efeito no controle de doenças, maçãs tratadas com vapor de ácido acético durante o estágio de pré-climatérico podem iniciar o amadurecimento prematuramente (DE POOTER et al., 1984).

Em 2002, Liu e Chu demonstraram que a podridão causada por *M. fructicola* foi reduzida de 64 % para 32 % e de 88 % para 25 % quando damascos e ameixas foram fumigados com 5 e 8 mg.L⁻¹ de ácido acético, respectivamente.

A doença causada por *P. expansum* e *P. digitatum* em frutos de caroço (damasco, pêssgo e nectarina) e citros, respectivamente, foi reduzida de 98 % para 16 % e de 86 % para 11 %, pela vaporização com 1,9 µL.L⁻¹ de ácido acético por 30 min, sem causar danos aos frutos (SHOLBERG, 1998).

Sholberg et al. (2000), em trabalho onde vários vinagres comuns contendo de 4,2 a 6,0 % de ácido acético foram testados para o controle de diferentes patógenos fúngicos em pós-colheita de frutos, verificaram que diferentes fatores podem influenciar na eficiência do controle, como: tempo e temperatura de vaporização, concentração de ácido acético e concentração de inóculo na superfície do fruto. O vapor de vinagre branco, contendo 5,0 % de ácido acético reduziu a doença causada por *B. cinerea* em morangos de 50 % para 1,4 %.

Bananas tratadas com 0,2 % de ácido acético glacial ou vinagre (0,2 % acidez titulável) através de infiltração, não apresentaram alterações nas características físicas e físico-químicas como firmeza, pH, acidez titulável ou sólidos solúveis. Porém, diferente do tratamento com ácido acético, o vinagre não reduziu a incidência de doenças pós-colheita; além disso, a preferência quanto ao sabor foi maior em bananas tratadas com ácido acético (ETHUGALA; KARUNARATNE, 2002).

A eficiência da vaporização com ácido acético, assim como com acetaldeído, no controle das doenças, depende do microrganismo, da concentração e do tempo de exposição (AHARONI; STADELBACHER, 1973; SHOLBERG; GAUNCE, 1995).

Os esporos de fungos patogênicos são mais susceptíveis ao ácido acético sob condições de alta umidade relativa (SHOLBERG; GAUNCE, 1995), apresentando-se, portanto, como um potencial substituto ao SO₂, o qual é comumente utilizado para o controle de podridões de uvas de mesa sob condições de alta umidade relativa. A

fumigação de cachos de uva com ácido acético ($8,0 \text{ mg.L}^{-1}$), seguida pelo armazenamento em atmosfera modificada a 0°C , reduziu a podridão causada por *B. cinerea* de 94 % para 2 %, exercendo também o controle da degradação das bagas, além de não afetar o pH, o odor e o sabor da fruta (MOYLS et al., 1996).

Sholberg et al. (1996) obtiveram redução no número de bagas deterioradas por *B. cinerea* pela fumigação com ácido acético ($8,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em uvas 'Selection 494' (43 %) e 'Selection 651' (89 %) após seis semanas de armazenamento à 2 ou 5°C , respectivamente. A diferença de resposta entre as cultivares sugere especificidade na interação fruto-patógeno-substância volátil (ARCHBOLD et al., 1997).

Zahavi et al. (2000) e Pen e Jiang (2003) relatam que o SO_2 foi retirado pelo Governo Federal dos Estados Unidos da lista dos produtos considerados seguros como sanitizantes (GRAS) de frutas e hortaliças e, portanto, seu uso futuro em uvas é incerto. Lydakakis e Aked (2003a) afirmam ser bastante provável que no futuro, o nível de resíduo permitido para o SO_2 seja zero. Por sua vez, os ácidos orgânicos têm sido extensivamente utilizados em alimentos nos últimos anos, e estão inseridos na lista GRAS (PERERA; KARUNARATNE, 2001).

A origem natural do ácido acético, seu metabolismo pelos frutos, sua presença na dieta humana através de frutos e hortaliças frescos e, sua natureza volátil, podem aumentar a aceitação deste produto por parte dos consumidores (ARCHBOLD et al., 1997).

4.4.2.3 Irradiação UV-C

Irradiação ultravioleta numa faixa de 200-280 nm é classificada como UV-C (LU et al., 1991). O comprimento de onda de 254 nm mostrou-se eficiente na indução de resistência em um grande número de produtos vegetais, como uva (LANGCAKE; PRYCE, 1977; NIGRO et al., 1998), citros (RODOV et al., 1992; STEVENS et al., 1996), maçã (STEVENS et al., 1996, CAPDEVILLE et al., 2002), pêssego (STEVENS et al., 1996), tomate (LIU et al., 1993), pimentão (MERCIER et al., 2001), batata-doce (STEVENS et al., 1999), cebola (LU et al., 1987), entre outros, quando aplicada em doses baixas (NIGRO et al., 1998).

Há duas explicações possíveis para a redução de podridões pela UV-C: efeito germicida e indução de resistência aos patógenos (STEVENS et al., 1996;

STEVENS et al., 1998; MERCIER et al., 2001). A resistência induzida pela irradiação a 254 nm parece estar relacionada com a produção de substâncias tóxicas (principalmente fenólicos) ao patógeno, através do aumento na atividade de enzimas-chave da síntese destas substâncias (DROBY et al., 1993; LANGCAKE; PRYCE, 1977). Muitos estudos indicam que mecanismos de resistência são induzidos e ativados na epiderme dos frutos tratados com a irradiação UV-C (DROBY et al., 1993; JEANDET et al., 1991; STEVENS et al., 1998; MERCIER et al., 2001).

A indução da resistência em pomelos (*Citrus paradisi* Macf) contra o desenvolvimento de *Penicillium digitatum* através da irradiação UV-C foi explicada pela indução de quitinase e β -1,3-glucanase na casca dos frutos (PORAT et al., 1999). Droby et al. (1993) observaram o aumento da FAL, bem como da peroxidase em pomelos após a aplicação de UV-C, sendo eficiente na redução de *P. digitatum*. Em “kumquat” (*Fortunella margarita* L. Swingle) inoculados com *P. digitatum*, houve aumento da fitoalexina escoparone na casca dos frutos tratados com UV-C, restringindo o crescimento do patógeno à polpa dos frutos; o desenvolvimento do patógeno ficou limitado em direção à superfície dos frutos, com conseqüente supressão da esporulação (RODOV et al., 1992).

Mercier et al. (2001), trabalhando com pimentão, afirmaram que aplicação de UV-C a $0,88 \text{ kJ.m}^{-2}$, 24 h antes da inoculação, reduziu a ocorrência de *B. cinerea* em frutos armazenados a 13° ou 20°C.

Irradiação UV-C na dose de $7,5 \text{ kJ.m}^{-2}$ levou à indução de quitinase, β -1,3-glucanase e FAL, em pêssegos, 1 h após o tratamento, alcançando nível máximo após 96 h (EL GHAOUTH et al., 2003a). Capdeville et al. (2002) obtiveram resultados satisfatórios de redução da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em maçãs irradiadas com a dose de $7,5 \text{ kJ.m}^{-2}$, 48 ou 96 h antes da inoculação com *P. expansum*.

As fitoalexinas do tipo estilbenos (resveratrol e pterostilbeno) foram eliciadas em bagas de uva quando expostas a irradiação UV-C (SARIG et al., 1997). Os mesmos autores relatam que estas fitoalexinas foram fungitóxicas *in vitro*, inibindo a germinação dos conídios e o crescimento do micélio de *R. stolonifer* e *B. cinerea*. Porém, o acúmulo destas substâncias declinou com o avanço da maturação das bagas, coincidindo com o aumento da predisposição ao ataque de patógenos. Creasy e Coffee (1988), analisando a

produção de resveratrol em bagas de uva irradiadas durante 10 min, estabeleceram que a quantidade do composto produzido 24 h após a irradiação UV-C foi escolhida para representar a produção potencial de fitoalexinas por cachos de uva. De maneira semelhante, Sarig et al. (1997) obtiveram o máximo acúmulo de resveratrol e pterostilbeno 24 h após a inoculação de bagas de uva 'Perlette' com suspensão de esporos de *R. stolonifer*. Quando irradiadas, independente do estágio de desenvolvimento das bagas, após alcançar uma concentração máxima, a quantidade de resveratrol caiu rapidamente, quase desaparecendo 50 h após a irradiação, enquanto a concentração de pterostilbeno, embora 4 a 8,5 vezes menor, permaneceu relativamente estável. O acúmulo das fitoalexinas estilbenos em bagas de uva, após a inoculação com *R. stolonifer* e *B. cinerea* foi menor do que após a eliciação com UV-C (SARIG et al., 1997).

A irradiação (10 min) de uvas em diferentes estádios de desenvolvimento mostrou que, as flores acumularam apenas traços de resveratrol, bagas após o pegamento produziram pequenas quantidades e, bagas maiores do que 5 mm de diâmetro produziram quantidades potencialmente inibitórias ao desenvolvimento de patógenos. A capacidade da epiderme de sintetizar resveratrol foi mantida até as bagas chegarem próximas à maturidade, quando o potencial de produção de fitoalexinas diminuiu com o aumento do conteúdo de sólidos solúveis. Ao atingirem 5 % de sólidos solúveis, as bagas não produziram concentrações potencialmente inibitórias deste composto (CREASY; COFFEE, 1988). Este mesmo padrão de comportamento na produção de resveratrol por bagas de uva irradiadas com UV-C foi observado por Jeandet et al. (1991).

O tratamento de cachos de uva 'Itália' com baixas doses de irradiação UV-C (até $0,25 \text{ kJ.m}^{-2}$), anterior à inoculação com *B. cinerea*, reduziu significativamente o número de bagas infectadas e o diâmetro das lesões, sugerindo indução de resistência à doença, tanto em bagas feridas antes ou após a irradiação (NIGRO et al., 1998).

Existem evidências que suportam a possibilidade de controle de doenças já instaladas em profundidade no tecido dos frutos (quiescentes), através do emprego da irradiação UV-C na pós-colheita. Stevens et al. (1998) demonstraram que a dose de $7,5 \text{ kJ.m}^{-2}$ foi eficiente em reduzir a infecção quiescente causada pelo fungo *M. fructicola* alojado a um 1 cm de profundidade no mesocarpo de pêssegos.

A irradiação UV-C além de exercer efeito germicida, pode prolongar o período de armazenamento dos frutos por retardar os processos de amadurecimento, suprimir a produção de etileno (LU et al., 1991; LIU et al., 1993; STEVENS et al., 1998) e eliciar respostas bioquímicas no tecido do hospedeiro que são relevantes no controle das doenças (STEVENS et al., 1999; MERCIER et al., 2001). Resultados de pesquisa com pêssegos e maçãs indicaram que o tratamento com UV-C causou um atraso no amadurecimento dos frutos (LU et al., 1991). As podridões de *A. alternata*, *B. cinerea* e *R. stolonifer* em tomate foram reduzidas pelas doses de UV-C de 3,6 a 7,5 kJ.m⁻², além dos frutos permanecerem mais firmes que a testemunha (LIU et al., 1993). Assim, a redução das podridões pode ser um efeito secundário devido ao atraso no processo de amadurecimento; com o avanço do amadurecimento a resistência dos frutos às doenças é menor (CREASY; COFFEE, 1988).

A inibição do desenvolvimento de doenças verificada por vários autores através do tratamento dos frutos antes da inoculação com o patógeno, sem contato direto do patógeno com a irradiação UV-C, leva a crer que a indução de mecanismos de defesa internos são mais importantes do que o efeito germicida sobre o patógeno. Além disso, a irradiação de frutos previamente inoculados em muitos casos deixou de prevenir a deterioração (MERCIER et al., 2001, RODOV et al., 1992; BEN-YEHOSHUA et al., 1992).

O êxito de um tratamento aplicado em pós-colheita destinado a evitar podridões depende dos seguintes fatores: inóculo inicial, profundidade da infecção no interior dos tecidos do fruto, velocidade de crescimento do patógeno, temperatura e umidade ambientes e, profundidade a que o agente de controle é capaz de penetrar/agir nos tecidos dos frutos (WILLS et al., 1998).

Anfoka (2000) sugere que, para aplicação prática dos resultados obtidos em estudos com possíveis indutores de resistência, é preciso muitos esforços para driblar os fatores que possam vir a afetar a eficiência deste indutor. Estes fatores incluem: a) período de tempo entre a aplicação do indutor e a inoculação com o patógeno, b) quantidade do agente indutor a ser aplicado e, c) modo de aplicação do indutor.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Tecnologia Pós-Colheita do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Hortifrutícolas – FRUTHOTEC, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, com o objetivo de avaliar o efeito de agentes bióticos e abióticos como método alternativo na proteção de uva ‘Itália’ contra *B. cinerea*. Realizaram-se também ensaios *in vitro* para verificar o efeito dos agentes de controle no crescimento micelial e na germinação dos conídios de *B. cinerea*. Além das análises fitopatológicas, os cachos de uva foram submetidos a análises físicas e físico-químicas, descritas a seguir:

5.1 Obtenção de isolados de *Botrytis cinerea*

Para a obtenção do patógeno de interesse (*B. cinerea*), foram realizados isolamentos a partir de uvas provenientes de diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo, sendo retirados fragmentos de bagas apresentando sintomas da podridão e procedendo-se a assepsia em álcool etílico (70 % v/v) durante 30 segundos e, na sequência, com hipoclorito de sódio (1,5 % v/v) por 60 segundos. Para a eliminação dos resíduos, os

fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada e colocados em papel-filtro para retenção do excesso de umidade. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para placas contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de oxitetraciclina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubados à 22°C sob alternância de luz (12 h), até o aparecimento de colônias bem definidas do fungo, as quais sofreram repicagens subsequentes em BDA, até a obtenção de colônias puras. Para conservação dos isolados, utilizou-se tubos de cultura com BDA mais 2 mL de óleo mineral Nujol ou água destilada esterilizada em frascos de penicilina (método de Castellani) (FIGUEIREDO, 1967; TUIE, 1969). Antes dos ensaios, realizou-se teste de patogenicidade, para seleção do isolado mais agressivo (U.53.1-04/02). Esse foi mantido em BDA a $\pm 22^\circ\text{C}$ e, contínuas reinoculações e reisolamentos em cachos de uva foram feitos para manter a patogenicidade do fungo.

5.2 Teste de patogenicidade e inoculação de *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália'

Para realização do teste de patogenicidade, cachos de uva foram desinfestados superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5 %) durante dois min; em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada e dispostos sobre papel absorvente para secagem da água superficial. Após a secagem, as bagas foram separadas em três lotes correspondendo a três diferentes métodos de inoculação que foram testados: (1) as bagas foram feridas com uma agulha de seringa de cromatografia (± 2 mm de profundidade); ou (2) com um bisturi (± 2 mm de extensão); ou (3) bagas sem ferimento. Posteriormente, as bagas foram aspergidas com suspensão de conídios ($\pm 10^5$ conídios.mL⁻¹) de *B. cinerea* e incubadas a $\pm 22^\circ\text{C}$ sob alternância de luz (12 h), até o aparecimento dos sintomas da doença. Pela maior precisão e facilidade de avaliação, optou-se pelo primeiro método.

Dessa forma, nos ensaios *in vivo*, em cada cacho de uva foram feridas 10 bagas, fazendo-se um furo por baga de ± 2 mm de profundidade com a agulha de uma seringa de cromatografia (CHAMBERS, 1990; ZAHAVI et al., 2000) (Apêndice 4). Após o ferimento, os cachos foram inoculados por aspersão de suspensão de conídios ($\pm 10^5$ conídios.mL⁻¹), determinada pela contagem em hemocitômetro, com adição de Tween 20 na

proporção de uma gota para 100 mL da suspensão, de acordo com metodologia descrita por Thomas et al. (1988) e Romanazzi et al. (2002), com modificações.

5.3 Efeito dos agentes de controle na proteção de uva 'Itália'

Cachos de uva 'Itália' provenientes das regiões produtoras do estado de São Paulo, Jales e São Miguel Arcanjo, foram submetidos aos diferentes tratamentos (extratos de cogumelos, quitosana, ácido acético ou irradiação UV-C). Para avaliação do efeito direto, os cachos foram inoculados com o patógeno e, após 4 h (BROOME et al., 1995), tratados com diferentes concentrações e/ou doses dos agentes de controle (Ensaio 1).

Com o objetivo de avaliar o potencial desses agentes na indução de resistência, cachos de uva foram ou não, aspergidos com extrato aquoso do basidiocarpo de *Agaricus blazei* (5 %), aspergidos com solução de quitosana (1,5 %) ou, vaporizados com ácido acético (10,5 mg.L⁻¹) e, inoculados após um intervalo de tempo de 24, 48, 72 ou 96 h com o fungo *B. cinérea* (Ensaio 2). No ensaio com a irradiação UV-C, cachos de uva foram ou não, irradiados com as diferentes doses de UV-C e, após 24 h, inoculados com o patógeno.

5.3.1 *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*

As amostras dos cogumelos, representadas pelo pó seco do basidiocarpo, foram cedidas pelo Núcleo de Produção de Cogumelos da Faculdade de Ciências Agrônômicas / UNESP, câmpus de Botucatu/SP. Para a obtenção dos extratos aquosos, o pó foi suspenso em água destilada (14 mL.g⁻¹) e, após 24 h de incubação à 10°C, as amostras foram filtradas à vácuo, utilizando-se papel-filtro Whatman n°1 e centrifugadas a 20.000 g por 25 min, sendo o sobrenadante filtrado em membrana tipo Millipore (diâmetro do poro = 0,2 µm), sob condições assépticas. Os filtrados esterilizados (extratos aquosos concentrados) foram armazenados em geladeira à 10°C e utilizados para as diluições. Extrato aquoso à 10 % v/v (10 mL de extrato concentrado + 90 mL de água destilada) representa: [(1000 mg.14 mL⁻¹). 10%] = 7,15 mg do pó seco de basidiocarpo.mL⁻¹.

Os cachos de uva maduros (Apêndice 8), foram aspergidos com diferentes concentrações dos extratos dos basidiocarpos (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 40,0 %),

obtidas através da diluição dos extratos aquosos concentrados e, em seguida, colocados sobre papel absorvente para retenção do excesso de umidade e secagem sob ventilação.

No ensaio 1, os cachos que haviam sido inoculados quatro horas antes do tratamento, foram acondicionados em caixas de papelão e mantidos a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR, por um período de seis dias. No ensaio 2, os cachos também acondicionados em caixas de papelão permaneceram a $1^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR até o momento do tratamento, sendo posteriormente transferidos para câmara de armazenamento a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR e, após 24, 48, 72 ou 96 h inoculados com *B. cinerea*, retornando às mesmas condições por mais quatro dias para avaliação da doença.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no ensaio 1 e, fatorial (2x4), representados por tratamento e intervalo entre o tratamento e a inoculação, no ensaio 2; com 10 repetições e um cacho de uva como unidade experimental.

5.3.2 Quitosana

Utilizou-se quitosana (fornecida pela empresa Cyrbe do Brasil, Sumaré/SP) extraída em ácido acético e diluída com água até a concentração de 2 %, com pH de 4,4. O produto apresentando alta viscosidade foi diluído em água destilada esterilizada para obtenção das concentrações desejadas. Cachos de uva foram aspergidos com diferentes concentrações de quitosana (2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25 ou 0,0 %) e, em seguida, colocados sobre papel absorvente para retenção do excesso de umidade e secagem sob ventilação. As condições de armazenamento e o delineamento experimental foram iguais aos descritos no item anterior (5.3.1).

5.3.3 Ácido acético

Cachos de uva foram vaporizados colocando-se 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 ou 4,0 mL de ácido acético glacial (densidade = $1,05 \text{ g.mL}^{-1}$) em placas de petri, no máximo 1 mL por placa para proporcionar total vaporização, as quais foram acondicionadas no interior de tambores de 200 L, hermeticamente fechados, providos de ventilador, o qual foi ativado

para melhor dispersão do vapor. As concentrações de ácido acético empregadas foram 0,0; 2,6; 5,2; 10,5 e 21,0 mg.L⁻¹. Dez cachos de uva por tratamento foram acondicionados em contentores plásticos no interior dos tambores, a uma distância de aproximadamente 20 cm acima das placas contendo o ácido acético (Apêndice 5). O tempo de vaporização foi de 30 min à 25°C±1°C / 70-80 % UR (SHOLBERG et al., 1996, SHOLBERG, 1998). Decorrida a vaporização, os tambores foram abertos, proporcionando ventilação. As condições de armazenamento e delineamento experimental foram iguais às descritas no item 5.3.1.

5.3.4 Irradiação UV-C

No laboratório, cachos de uva 'Itália' foram desinfestados superficialmente; estes se apresentavam maduros, com teor de sólidos solúveis de aproximadamente 14 °Brix, acidez titulável de 0,87 g de ácido tartárico.100 g⁻¹, com ráquis verde, fresca e túrgida. Na sequência, os cachos foram inoculados e após 4 h irradiados ou, irradiados e após 24 h inoculados.

Os cachos foram irradiados com lâmpada UV germicida (2,5 cm x 88 cm, 30 W, produzida pela empresa Yaming Lighting), cujo pico do comprimento de onda emitido é de 254 nm, com taxa de fluência de 1,74 mW.cm⁻² medida através de um radiômetro digital (UVX; Ultraviolet Products, Inc., San Gabriel, CA). Irradiaram-se os cachos variando o tempo, a uma distância de, aproximadamente, 10 cm da fonte de luz (Apêndice 6), segundo metodologia descrita por Mercier et al. (2001), com modificações. As doses foram determinadas pelo tempo de exposição à irradiação, de acordo com procedimento proposto por Stevens et al. (1999).

Os cachos de uva 'Itália' foram expostos a doses de UV-C (em kJ.m⁻²) e tempo de exposição (em segundos) de: 0,00 kJ.m⁻² para 0,00 s; 0,84 kJ.m⁻² para 48 s; 1,30 kJ.m⁻² para 74,4 s; 2,40 kJ.m⁻² para 138 s; 3,60 kJ.m⁻² para 207 s; 4,80 kJ.m⁻² para 276 s e 7,50 kJ.m⁻² para 430,8 s.

Após a irradiação, os cachos foram acondicionados em caixas de papelão e mantidos no escuro, para minimizar o processo de fotoreversibilidade (STEVENS et al., 1998), por um período de cinco dias, à 25±1°C / 80-90 % UR. O delineamento

experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e um cacho de uva como unidade experimental.

5.3.5 Análises fitopatológicas e análise dos dados

Avaliações de incidência e severidade (escala de notas) foram realizadas diariamente nas 10 bagas inoculadas de cada cacho. A escala de notas adotada para avaliação da severidade da doença variou de 1 a 6, com base na área da lesão, correspondendo, aproximadamente, a 2, 5, 10, 20, 30 e 50 % da baga lesionada, respectivamente. Os resultados foram expressos em índice de doença calculado através da fórmula: ID (%) = $\{[(n_1 \times 1) + \dots + (n_6 \times 6)] \times (6 \times N)^{-1}\} \times 100$, onde, $n_{1..6}$ = n° de bagas infectadas com a respectiva nota e N = n° total de bagas inoculadas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. Para efeito de análise estatística, as médias resultantes da avaliação fitopatológica foram transformadas em $\sqrt{x + 0,5}$. Além da comparação de médias, análises de regressão polinomial foram feitas para se verificar a relação entre dose e índice de doença (GOMES, 1990).

No ensaio com irradiação UV-C, utilizou-se ainda, o modelo logístico proposto por Bergamin Filho & Amorim (1996) para análise dos dados referentes ao índice de doença (*in vivo*) e crescimento radial (*in vitro*). No final do armazenamento dos cachos irradiados com UV-C, ou seja, no quinto dia após o tratamento, tomou-se três bagas por parcela (cachos), dentre as dez inoculadas, colocando-as em um béquer ao qual adicionou-se 25 mL de água destilada esterilizada; para melhor dispersão dos conídios acrescentou-se Tween 20. Após leve agitação, contou-se o número de conídios contidos na suspensão em hemocitômetro, efetuando-se três repetições por tratamento. Esta metodologia foi adaptada de Stevens et al. (1998).

5.3.6 Análises físicas e físico-químicas das uvas

Estas análises foram realizadas a fim de se comparar o efeito das diferentes concentrações e/ou doses dos agentes de controle na qualidade das uvas após o armazenamento.

No segundo ensaio (cogumelos, quitosana e ácido acético), com tratamento seguido de inoculação, considerando o momento da inoculação como tempo zero, as análises físicas e físico-químicas iniciais foram realizadas a -24, -48, -72 e -96 h visando avaliar se as uvas encontravam-se em condições semelhantes às apresentadas no momento da colheita, devido ao fato de terem sido armazenadas à $1^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR. Foram realizadas também análises no momento da inoculação para verificar o efeito dos agentes sobre as bagas de uva e, ao final do experimento, de acordo com metodologia descrita a seguir:

- a) **Aparência da ráquis:** adotou-se uma escala de notas com base no trabalho de Harvey et al. (1988): 1 = verde, fresca, túrgida, 2 = verde opaca, 3 = verde para marrom clara, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seca;
- b) **Degrana:** determinada através da pesagem do cacho inteiro e das bagas naturalmente soltas, obtendo-se através de cálculo a % de degrana ($D\% = (\text{peso bagas soltas} / \text{peso total do cacho}) \times 100$);
- c) **Cor de baga:** com colorímetro Minolta, sistema $L^* a^* b^*$, onde L^* representa luminosidade (0 = preto e 100 = branco), a^* e b^* cromaticidade (a^- = verde a a^+ = vermelho e, b^- = azul a b^+ = amarelo), obtendo-se a média da cor de três bagas da região superior, três da mediana e três da inferior, por cacho. Posteriormente calculou-se os valores de Croma e HUE através das fórmulas: $\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2}$ e $\text{HUE} = \tan^{-1}(b/a) \times 180/\text{PI}$.
- d) **Sólidos Solúveis (SS):** utilizou-se um refratômetro manual, com escala de 0 a 32°Brix;
- e) **pH:** determinado potenciométricamente em pHmetro (CARVALHO et al., 1990);

f) **Acidez titulável (AT)**: determinada empregando-se NaOH (0,1N) por titulação até atingir pH 8,1. O resultado foi expresso em g de ácido tartárico.100 mg⁻¹ de suco (CARVALHO et al., 1990).

Para as análises de sólidos solúveis, pH e acidez titulável utilizou-se o suco de oito bagas por cacho, sendo duas bagas da região superior, quatro da mediana e duas da inferior, com cinco repetições (cachos) por tratamento.

É importante ressaltar que as análises físicas e físico-químicas foram realizadas de acordo com a necessidade, dessa maneira, nem todas as análises descritas acima foram feitas em todos os experimentos.

5.4 Efeito dos agentes de controle sobre *Botrytis cinerea in vitro*

Para cada agente de controle foram realizados dois ensaios: 1) efeito dos agentes na germinação de conídios de *B. cinerea* e; 2) efeito no crescimento radial das colônias do patógeno.

Primeiramente, com o objetivo de se avaliar o efeito dos agentes de controle na germinação de conídios de *B. cinerea*, placas de poliestireno contendo meio de cultura ágar-água (AA) foram divididas em quatro quadrantes. Cada um destes recebeu uma gota ($\pm 30 \mu\text{L}$) de suspensão de conídios ($\pm 10^5$ conídios.mL⁻¹), adicionada ou não dos agentes de controle. Na avaliação, contou-se 50 conídios por quadrante, pela observação em microscópio óptico. Foi considerado germinado quando o tubo germinativo apresentava tamanho igual ou superior ao maior diâmetro do conídio (EL GHAOUTH et al., 1992a; FRANCO, 1999; MERCIER et al., 2001).

No segundo ensaio, após solidificação do meio de cultivo (BDA), cada placa recebeu, na parte central, um disco de 3 mm de diâmetro contendo micélio de *B. cinerea*, retirados da borda de colônias provenientes de culturas com três dias de cultivo (EIKEMO et al., 2003). O crescimento micelial de *B. cinerea* foi determinado diariamente, medindo-se o diâmetro da colônia em direções ortogonais, até que as colônias do tratamento testemunha atingissem a borda da placa (EL GHAOUTH et al., 1992a; TERRY; JOYCE, 2000; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EIKEMO et al., 2003). O crescimento radial foi

obtido através da subtração da medida do disco de micélio (3 mm) da média final do diâmetro da colônia, dividido por dois.

As placas, uma como unidade experimental, foram mantidas à $\pm 22^{\circ}\text{C}$ sob alternância de luz (12 h) até a germinação dos conídios ou crescimento do micélio. Para ambos os ensaios o delineamento foi inteiramente casualizado com um número variável de repetições (5 a 10).

5.4.1 *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*

Para avaliação do efeito dos extratos dos cogumelos na germinação de conídios de *B. cinerea*, adicionou-se à suspensão de conídios os extratos aquosos dos basidiocarpos nas proporções de 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 40,0 %. Utilizaram-se dez repetições por tratamento.

No segundo teste *in vitro* os extratos aquosos de basidiocarpos foram incorporados em meio BDA acrescido de antibiótico (clorotetraciclina – $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ + cloranfenicol – $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) à 45°C , nas proporções de 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 40,0 % e, vertidos em placas de poliestireno. Um número de sete e seis repetições, respectivamente, para *A. blazei* e *L. edodes*, foram utilizadas.

5.4.2 Quitosana

No primeiro ensaio, adicionou-se à suspensão de conídios ($\pm 10^5$ conídios.mL⁻¹) de *B. cinerea*, solução de quitosana nas proporções de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 %. Posteriormente, para avaliação do produto sob o crescimento radial do fungo, quitosana foi incorporada em meio BDA acrescido de antibiótico (oxitetraciclina) à 45°C , nas proporções de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 %. Utilizaram-se cinco e nove repetições por tratamento no primeiro e segundo ensaio, respectivamente.

5.4.3 Ácido acético

Para verificar o efeito do vapor de ácido acético na germinação dos conídios de *B. cinerea*, as placas (abertas), contendo a suspensão de conídios, foram submetidas a seis diferentes doses de vapor (0,0; 2,6; 5,2; 10,5 e 21,0 mg.L⁻¹) nos mesmos tambores de 200 L utilizados para a vaporização dos cachos de uva. Utilizaram-se seis repetições por tratamento.

No segundo ensaio, placas contendo disco de micélio do fungo, em número de dez por tratamento, foram incubadas no escuro a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ por sete horas para que o fungo iniciasse o desenvolvimento, antes de serem tratadas com as diferentes doses de ácido acético (0,0; 2,6; 5,2; 10,5 e 21,0 mg.L⁻¹). Para ambos os ensaios, o tempo de vaporização foi de 30 min à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ / 70-80 % UR.

5.4.4 Irradiação UV-C

No primeiro ensaio, submeteram-se as placas (abertas), contendo a suspensão de conídios de *B. cinerea*, a dez diferentes doses de irradiação: 0,00; 0,20; 0,40; 0,60; 0,84; 1,30; 2,40; 3,60; 4,80; 7,50 kJ.m⁻².

Para o segundo ensaio, os discos de micélio de *B. cinerea* foram retirados da borda de colônias provenientes de culturas monospóricas. Incubaram-se as placas na ausência de luz à $\pm 22^{\circ}\text{C}$ por sete horas antes de serem tratadas com a UV-C. Os tratamentos constaram das seguintes doses: 0,00; 0,20; 0,40; 0,60; 0,84; 1,30; 2,40; 3,60; 4,80; 7,50 kJ.m⁻². Nos ensaios com irradiação UV-C, as placas irradiadas foram mantidas no escuro a $\pm 22^{\circ}\text{C}$ até a germinação dos conídios ou o crescimento radial do patógeno. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento em ambos os ensaios.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados a seguir os resultados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* do efeito dos agentes bióticos e abióticos no índice de doença, crescimento micelial e germinação de conídios de *B. cinerea*, além das avaliações dos parâmetros físicos e físico-químicos dos cachos de uva.

6.1 *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*

6.1.1 Efeito dos extratos dos basidiocarpos na proteção de uva ‘Itália’

6.1.1.1 Tratamento pós-inoculação

Observando-se as Figuras 1 e 2 e o Apêndice 7, verifica-se que as diferentes concentrações dos extratos dos cogumelos *A. blazei* ou *L. edodes* aplicados em uva ‘Itália’, após 4 h da inoculação com *B. cinerea*, não diferiram estatisticamente quanto ao índice de doença. Contudo, nota-se os menores valores de ocorrência de podridão nos cachos tratados com extrato de *A. blazei* à 5 %, ao longo dos dias de avaliação. Redução esta

observada para o extrato do cogumelo *L. edodes* apenas na maior concentração (40,0 %). O extrato de *A. blazei* nas concentrações até 20,0 % foi mais eficiente que o de *L. edodes* na redução do mofo cinzento em uva.

Extratos de *L. edodes* e de *A. blazei* conferiram proteção local em plantas de maracujazeiro contra o vírus do endurecimento dos frutos (PWV) (DI PIERO 2003). O autor afirma que os extratos destes dois cogumelos podem ativar mecanismos de defesa vegetal contra o vírus do endurecimento dos frutos (PWV), mas não em magnitude suficiente para proteger uma espécie de interesse econômico que é invadida sistemicamente pela virose. Da mesma forma que o obtido no patossistema em estudo (*B. cinerea* - uva 'Itália'), o autor observou que isolados de *L. edodes* proporcionaram uma proteção menor em relação à conferida por isolados de *A. blazei* em maracujazeiro. Ainda, a proteção foi dependente da concentração do extrato e do intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação; concentrações de extrato de *L. edodes* inferiores à 40,0 % não foram eficientes em reduzir a incidência da virose. Estes dados são semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Por esta razão, optou-se por utilizar o extrato de *A. blazei* no segundo experimento (tratamento seguido de inoculação) na concentração de 5,0 % e, visto a menor eficiência de controle e a inviabilidade econômica do uso do extrato de *L. edodes* em doses acima de 40,0 %, este não foi testado.

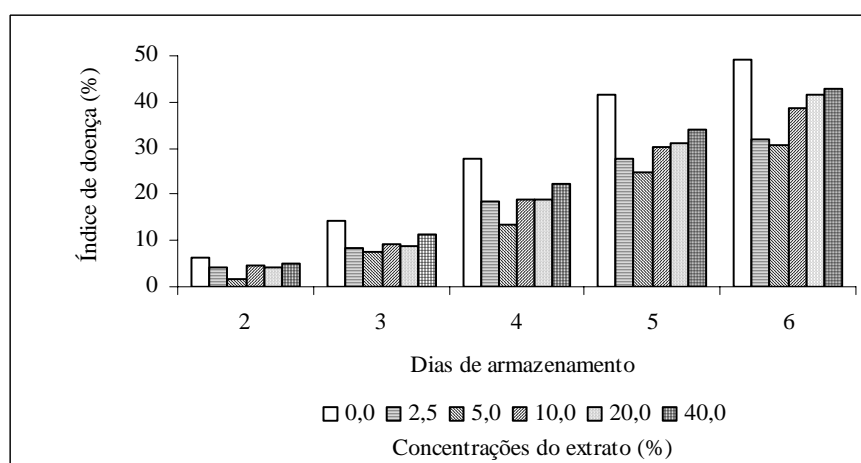


Figura 1. Índice de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália', inoculados e após 4 h tratados com diferentes concentrações do extrato de *Agaricus blazei*. Médias de dez repetições que não diferiram estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

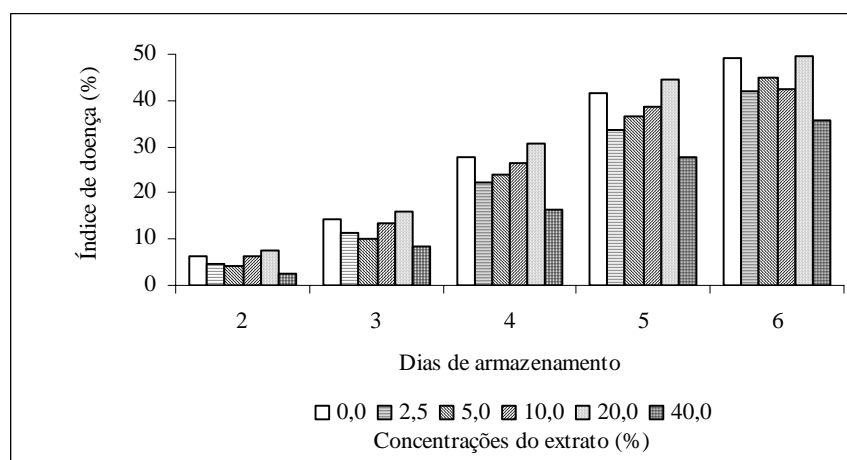


Figura 2. Índice de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália', inoculados e após 4 h tratados com diferentes concentrações do extrato de *Lentinula edodes*. Médias de dez repetições que não diferiram estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

Os dados apresentados no Apêndice 8 mostram as condições em que os frutos apresentavam-se no início e ao final do experimento 1, ou seja, após seis dias de armazenamento sob condições ambiente. Verifica-se que dentro de cada linhagem de cogumelo testada não houve diferença entre os valores de acidez titulável, pH, sólidos solúveis e aparência da ráquis. No entanto, para o parâmetro cor de baga, os dados indicam que os frutos tratados com extrato de *A. blazei* à 10,0 % ficaram mais escuros, adquirindo tonalidade marrom. Provavelmente, esta diferença de cor não se deva ao tratamento com o extrato, mas à variação da própria amostra vinda do campo.

A senescência fisiológica das uvas é um fenômeno normal. Eventualmente o tecido da polpa se torna pardo, o que dá às bagas brancas aparência parda opaca. Não há uma explicação clara para a ocorrência esporádica desta desordem, além disso, o início na mudança da coloração pode ser acelerado por meio de estresses fisiológicos, tais como danos mecânicos e temperaturas elevadas (NELSON, 1984c). Quanto ao parâmetro aparência da ráquis, esta se apresentava verde, fresca e túrgida (nota 1) no início do experimento, passando para predominantemente marrom a seca no final do armazenamento (nota 4 - 5), independente do tratamento. As mudanças nas características físicas e físico-químicas da uva devem-se ao processo de senescência que tem início na colheita dos cachos.

Haja vista, que a uva é uma fruta não-climatérica, mínimas alterações nos teores de sólidos solúveis e acidez titulável podem ser decorrentes da respiração e da transpiração, considerando-se que a fruta apresenta alta relação superfície/volume, tornando-a muito predisposta ao murchamento e secamento da ráquis (BENATO, 2003a).

6.1.1.2 Tratamento pré-inoculação com *Agaricus blazei*

Os resultados do índice de doença em cachos de uva tratados com extrato do cogumelo *A. blazei* (5,0 %), 24, 48, 72 ou 96 antes da inoculação dos cachos com *B. cinerea* estão apresentados na Tabela 1.

Constata-se que, o intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação exerceu maior influência sobre o índice de doença causada por *B. cinerea* do que o fator tratamento (com ou sem extrato). Quanto ao fator tratamento, verifica-se que a aplicação do extrato aquoso de *A. blazei* não resultou em proteção eficiente da uva contra o patógeno, tendo em vista que, quando aplicado 24, 48 ou 96 h antes da inoculação, o índice de doença não diferiu estatisticamente das respectivas testemunhas (sem extrato) e, ainda, quando aplicado 72 h antes da inoculação, o índice de doença foi significativamente maior que a testemunha. Contudo, cachos de uva tratados com *A. blazei*, 96 h antes da inoculação, apresentaram valores médios de índice de doença significativamente menores do que cachos tratados 72 h antes da inoculação com *B. cinerea*.

Tabela 1. Efeito do extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %), sobre o índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* após o tratamento e, armazenados a 25±1°C / 80-90 % UR.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
Dias de armazena/o	Trata/os	24 h	48 h	72 h	96 h		Média
2	Com <i>Agaricus</i>	10,17 ^y Aa	9,84 ABa	12,84 Aa	5,30 Ba	**	9,53 a
	Sem <i>Agaricus</i>	12,00 Aa	10,00 ABa	6,83 Bb	7,00 ABa	*	8,96 a
		ns	ns	**	ns		
	Média	11,08 A	9,92 A	9,83 A	6,15 B		
C.V. (%)		23,76					
3	Com <i>Agaricus</i>	22,00 ABa	22,35 ABa	32,67 Aa	14,67 Ba	**	22,92 a
	Sem <i>Agaricus</i>	30,00 Aa	23,67 Aa	19,34 Ab	17,67 Aa	ns	22,67 a
		ns	ns	**	ns		
	Média	26,00 A	23,01 AB	26,00 A	16,17 B		
C.V. (%)		25,32					
4	Com <i>Agaricus</i>	41,83 ABa	48,83 ABa	57,67 Aa	29,00 Ba	**	44,33 a
	Sem <i>Agaricus</i>	49,50 Aa	43,33 Aa	34,83 Ab	34,17 Aa	ns	40,46 a
		ns	ns	**	ns		
	Média	45,67 A	46,08 A	46,25 A	31,58 A		
C.V. (%)		22,42					

^y Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre o índice de doença, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. Interação = **, * e *, para 2, 3 e 4 dias de armazenamento, respectivamente.

O Apêndice 9 apresenta os valores obtidos nas análises físicas e físico-químicas dos cachos de uva antes de serem submetidos aos tratamentos com o extrato de *A. blazei*, a 5,0 %, com o intuito de verificar se todos os cachos tinham as mesmas condições antes de receberem o tratamento, como se tivessem sido colhidos no momento do tratamento, enquanto nos Apêndices 10a e 10b apresentam-se os dados das características físicas e físico-químicas obtidos 24, 48, 72 ou 96 h após os tratamentos com os extratos, ou seja, no momento da inoculação com *B. cinerea*.

Observando-se o Apêndice 9, nota-se que pelo fato dos cachos terem sido mantidos sob refrigeração ($1^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR) até o momento da inoculação, estes não apresentaram diferenças na maioria das avaliações físicas e físico-químicas, o único parâmetro a apresentar diferença significativa foi a cor de baga. Os valores de Hue mostram uma perda significativa da coloração verde, tendendo para o amarelo; por sua vez, o Croma indica que as bagas ficaram mais opacas com o armazenamento. Rematales et al. (2003) relatam que não houve mudanças no conteúdo de sólidos solúveis e acidez titulável em uva 'Red Globe' armazenada a 0°C por quatro dias. Quanto às análises realizadas no momento da inoculação (Apêndices 10a e 10b), observa-se diferenças significativas apenas nos valores de pH, porém, as diferenças são tão ínfimas que seriam imperceptíveis ao paladar, além disso, não correspondem a alterações de acidez titulável, cujos valores não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados das análises físicas e físico-químicas finais, de cachos de uva 'Itália' tratados com extrato de *A. blazei* (5,0 %) e, após 24, 48, 72 ou 96 h inoculados com *B. cinerea*, encontram-se nos Apêndices 11a e 11b, onde verifica-se que os parâmetros sólidos solúveis, acidez titulável e pH, não diferiram estatisticamente da testemunha ao final do experimento, ao contrário da cor de baga que mostrou diferença no parâmetro L^* (luminosidade), entre cachos tratados 24 e 72 antes da inoculação, no parâmetro a^* (verde-vermelho) entre os cachos tratados ou não com o extrato 48 h antes da inoculação e entre os cachos tratados, independente do momento e, no parâmetro b^* (azul-amarelo), entre os cachos tratados ou não com o extrato de *A. blazei*. Quanto à aparência da ráquis, em todos os tratamentos, inclusive na testemunha, os cachos apresentavam ráquis marrom e seca (nota 5).

Assim sendo, novas pesquisas deverão ser conduzidas com o objetivo de se explorar melhor a viabilidade do uso dos extratos dos basidiocarpos de *L. edodes* e *A. blazei*, uma vez que estes têm demonstrado resultados satisfatórios em outros produtos vegetais. Talvez não só o uso dos extratos brutos, mas frações obtidas a partir destes extratos, possam ser utilizadas isoladamente, ou em combinação com outros métodos de controle do mofo cinzento em uva. Infelizmente no Brasil, a produção de cogumelos comestíveis ainda é escassa, o que eleva o custo do produto comercializado.

6.1.2 Efeito dos extratos de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

De modo significativo os extratos brutos de ambos os basidiocarpos estimularam a germinação dos conídios em todas as concentrações testadas (Figura 3 e Apêndice 12). Os conídios foram considerados germinados quando o tratamento atingiu 80 % ou mais de germinação, o que ocorreu após 8 h de terem sido submetidos aos tratamentos. Dados semelhantes foram constatados por Piccinin (2000), que verificou, ao utilizar preparações de filtrado de basidiocarpo autoclavado de *L. edodes*, que houve um estímulo na germinação de esporos de *Colletotrichum sublineolum*.

Segundo Di Piero (2003), os extratos dos basidiocarpos, principalmente os de *A. blazei*, estimularam a germinação *in vitro* de esporos de *C. lagenarium*, e provocaram aumento no comprimento do tubo germinativo desses esporos em relação aos que germinaram no tratamento testemunha. Além disso, os isolados LE 95/01 e LE 96/22 de *L. edodes*, utilizados a 10,0 % (v/v), não apresentaram efeito *in vitro* sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, quando esta foi empregada nas concentrações de 0,15 ou 0,05 unidades de absorvância (U.A.), enquanto os isolados ABL 97/11 e principalmente ABL 99/28 de *A. blazei* estimularam o crescimento bacteriano em ambas as concentrações, mostrando que, nestas situações, o aspecto nutricional dos extratos de basidiocarpos superou qualquer composto antibiótico que pudesse estar presente nos mesmos.

Adversamente, resultados positivos foram obtidos por Fiori et al. (2001; 2002), que verificaram o efeito do extrato bruto de *L. edodes* na inibição da germinação de esporos de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*; entretanto, o extrato bruto obtido à partir do *A.*

blazei não inibiu a germinação de esporos de *B. sorokiniana*, embora ambos os extratos tenham sido capazes de induzir o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja.

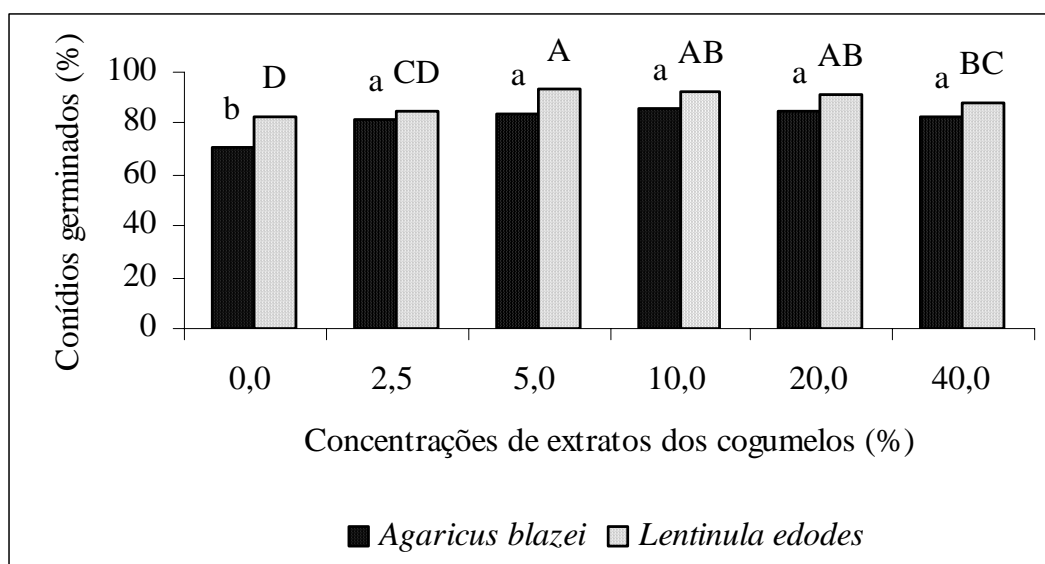


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de extratos dos cogumelos, *in vitro*, sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, após 8 h. Média de dez repetições. Médias seguidas de mesma letra, minúscula para *Agaricus blazei* e maiúscula para *Lentinula edodes*, não diferem significativamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

A avaliação do efeito dos extratos dos basidiocarpos sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* revelou que, *A. blazei*, assim como no teste de germinação dos conídios, estimula o crescimento micelial do patógeno em doses superiores a 2,5 % de modo significativo, porém, com 96 h todos os tratamentos assemelharam-se à testemunha (Figura 4 e Apêndice 13). Uma das hipóteses para explicar o estímulo, tanto na germinação dos conídios como no crescimento micelial seria a presença não só de proteínas de alto valor biológico encontradas na composição dos cogumelos, como também de vitaminas e elementos químicos tais como fósforo, magnésio, cálcio, ferro, entre outros (URBEN; OLIVEIRA, 1998), que podem ter estimulado o crescimento do patógeno.

Por conseguinte, *L. edodes* mostrou-se eficiente em retardar o crescimento micelial de *B. cinerea* na dose igual ou superior a 10,0 %, mas o efeito da concentração se tornou menos significativo com o passar do tempo, uma vez que, 96 h após a inoculação das placas, apenas a concentração de 40,0 % diferiu da testemunha (Figura 5 e Apêndice 14).

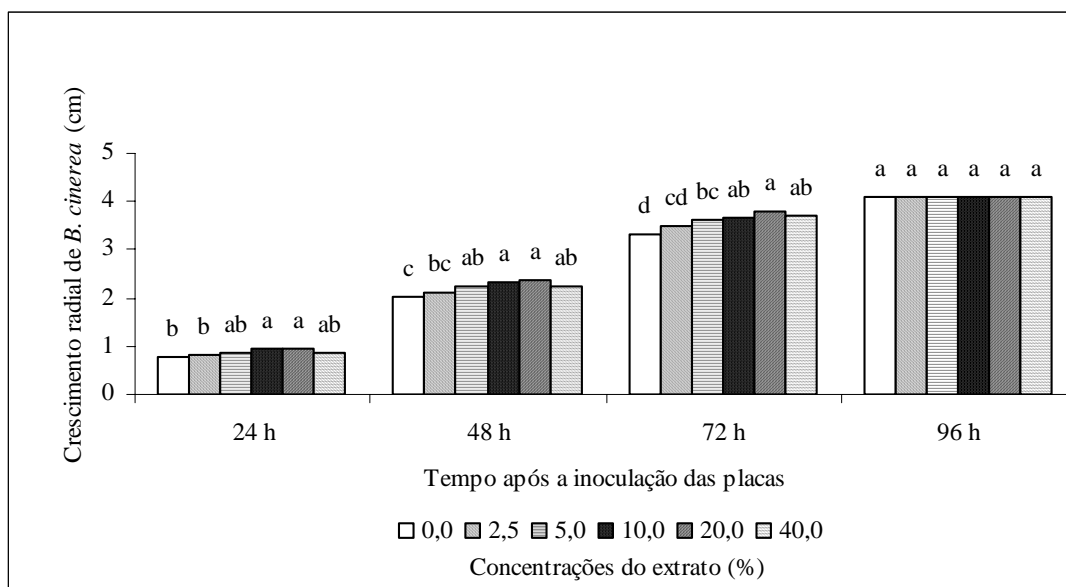


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de extratos do *Agaricus blazei* sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Média de sete repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

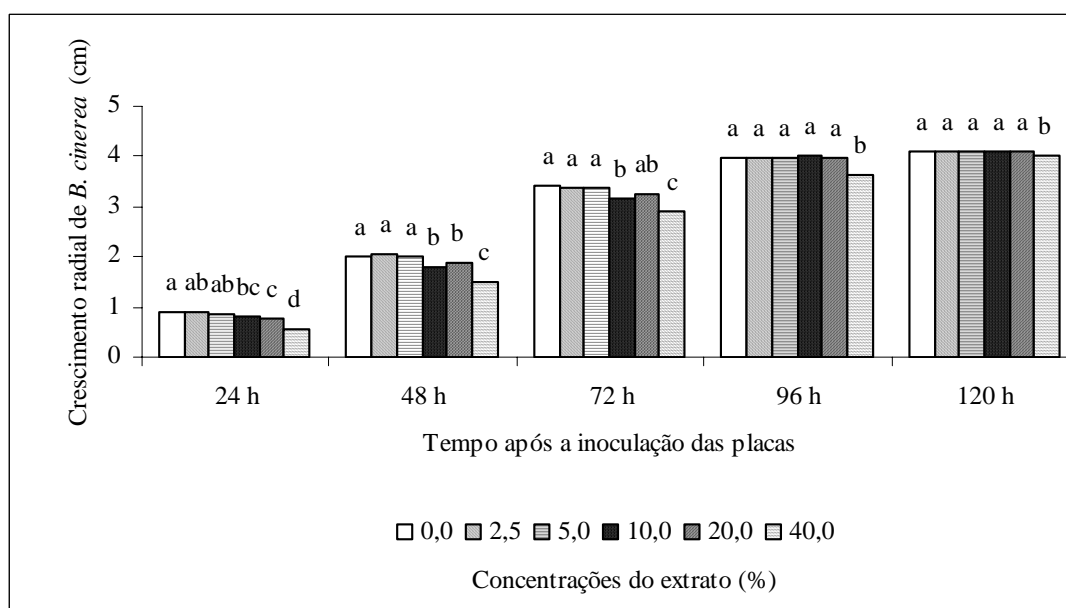


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de extratos do *Lentinula edodes* sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Média de seis repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

Estes resultados vão ao encontro aos apresentados por Di Piero (2003), onde extratos aquosos de *L. edodes*, incorporados ao BDA à 5,0 %, reduziram o

crescimento micelial de *C. lagenarium*, porém, o efeito apesar de significativo estatisticamente, foi pouco pronunciado. À 10,0 %, não houve efeito dos extratos de *L. edodes*, bem como de *A. blazei* sobre o crescimento micelial do fitopatógeno.

Verifica-se, de modo geral, que o extrato de *A. blazei* não inibiu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *B. cinerea*, *in vitro*, porém, os resultados obtidos no ensaio 2, *in vivo*, onde o extrato do basidiocarpo foi aspergido em cachos de uva 'Itália' mostram controle da doença, embora não significativo, quando aplicado 96 h antes dos cachos serem inoculados com o patógeno. Isso indica uma possível ativação de mecanismos de resistência no tecido dos frutos.

6.2 Quitosana

6.2.1 Efeito da solução de quitosana na proteção de uva 'Itália'

6.2.1.1 Tratamento pós-inoculação

As diferentes concentrações de quitosana quando aplicadas 4 h após a inoculação dos cachos de uva, foram eficientes em reduzir o índice de doença causado por *B. cinerea* (Tabela 2 e Apêndice 15). Nota-se que, com exceção da concentração de 0,25 % de quitosana, de um modo geral, as demais reduziram o índice de doença comparados aos índices obtidos em cachos não tratados; sendo observados os menores valores de ocorrência de podridão nos cachos tratados com 1,5 e 2,0 % de quitosana ao longo dos dias de avaliação. Nos quatro primeiros dias de armazenamento, as doses de 1,5 e 2,0 % diferiram significativamente da testemunha, sendo esta diferença menos acentuada nos dois últimos dias de avaliação.

Tabela 2. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* e tratados, por aspersão, após 4 h, com diferentes concentrações de quitosana e armazenados por 6 dias a 25±1°C / 80-90 % UR.

Tratamentos (%)	Dias de armazenamento				
	2	3	4	5	6
0,00	16,33* a	36,83 a	67,33 a	82,00 a	91,17 ab
0,25	18,33 a	40,67 a	70,83 a	84,34 a	97,50 a
0,50	16,17 a	33,17 ab	61,83 a	86,33 a	91,17 ab
1,00	13,50 ab	29,83 abc	54,50 ab	82,00 a	90,17 ab
1,50	10,33 b	23,67 bc	41,50 b	70,33 a	79,00 b
2,00	10,00 b	21,67 c	40,33 b	64,67 a	76,67 b
C.V. (%)	30,68	26,67	23,78	23,75	15,57

* Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

El Ghaouth et al. (1991a) não verificaram qualquer efeito adicional no controle de *B. cinerea* em morangos com o aumento na concentração de quitosana de 1,0 para 1,5 %. Como a quitosana tem a capacidade de inibir o crescimento de vários fungos, induzir a produção de quitinase e eliciar a produção de fitoalexinas no tecido do hospedeiro, os autores sugeriram que o controle da doença em morangos pode ser devido à propriedade fungistática da quitosana ou pela sua habilidade de induzir enzimas de defesa (quitinase e β -1,3-glucanase) e fitoalexinas, ou a combinação de mais de um modo de ação. Os mesmos autores em 1992 (a), também trabalhando com morango, não obtiveram redução adicional nas doenças causadas por *B. cinerea* e *R. stolonifer* quando a concentração de quitosana foi aumentada de 10 para 15 mg.mL⁻¹. Desta vez os autores afirmavam que o controle da doença parece estar mais relacionado à propriedade fungistática da quitosana do que à sua habilidade de induzir enzimas de defesa tais como quitinase, quitosanase e β -1,3-glucanase, tendo em vista que estas enzimas não foram estimuladas (EL GHAOUTH et al., 1992a).

Zhang e Quantick (1997) afirmam que o aumento na concentração de quitosana não aumentou significativamente o controle do escurecimento ou das doenças em pós-colheita de lichias. O mesmo foi constatado por Eikemo et al. (2003), onde as menores concentrações de quitosana (10 e 50 μg i.a./planta) resultaram em menor índice de doença comparadas com concentrações maiores (250 e 1000 μg i.a./planta).

Os dados apresentados no Apêndice 16 mostram as condições em que os cachos apresentavam-se no início e ao final do experimento 1, ou seja, após seis dias de armazenamento sob condições ambiente. Verifica-se que não houve diferença entre os valores de acidez titulável, pH, sólidos solúveis e aparência da ráquis. Tendo em vista que uvas possuem baixa quantidade de amido, seu conteúdo de açúcar não aumenta significativamente após a colheita (KANELLINS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993). Em alguns casos, o aumento nos conteúdos de sólidos solúveis e acidez titulável pode coincidir com a perda de massa dos cachos durante o armazenamento, sendo provável que o suco das bagas torna-se concentrado pela perda de água (KANELLINS; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1993). Para o parâmetro cor de baga, os dados indicam uma variação de tonalidade entre os cachos dos diferentes tratamentos, onde cachos tratados com 0,5 e 2,0 % apresentaram-se mais verdes. Provavelmente, esta diferença de cor não se deva ao tratamento com a quitosana, mas à variação da própria amostra. De maneira semelhante, a aplicação de quitosana não influenciou no conteúdo de sólidos solúveis ou porcentagem de perda de massa durante o armazenamento de mamões em temperatura ambiente (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003). Quanto ao parâmetro aparência da ráquis, esta apresentava-se verde, fresca e túrgida (nota 1) no início do experimento, passando para predominantemente marrom a seca no final do armazenamento (± 4), independente do tratamento.

Embora não tendo sido avaliada, sabe-se que uma das principais causas de perdas de uvas de mesa na pós-colheita advém da sua alta suscetibilidade à desidratação (MORALES, 1984; GONZALEZ et al., 2003), principalmente quando armazenadas por longos períodos. Neste sentido, El Ghaouth et al. (1991b) mostraram que pimentões e pepinos tratados com 1,0 e 1,5 % de quitosana apresentaram menor perda de massa quando armazenados a 13 ou 20°C. Conseqüentemente, o emprego de quitosana em cachos de uva visando o controle de *B. cinerea* e da desidratação dos cachos apresenta-se

como uma medida promissora, pois, ambos podem aumentar as perdas quantitativas e qualitativas desta fruta em pós-colheita.

Cachos de uva tratados com quitosana não apresentaram qualquer sinal aparente de fitotoxicidade, como observado por outros autores em morangos, pêras, kiwis, pimentões (EL GHAOUTH et al., 1991a; DU et al., 1997; EL GHAOUTH et al., 1994). Embora a análise de cor realizada com auxílio do colorímetro não tenha mostrado claramente, as uvas tratadas com as maiores concentrações de quitosana ficaram brilhantes (Figura 6); o mesmo foi observado por Romanazzi et al. (2002), também em uva 'Itália'.

Pelo fato das maiores concentrações apresentarem os melhores resultados de controle da doença, optou-se por utilizar a solução de quitosana no segundo experimento (tratamento-inoculação) na concentração de 1,5 %.



Figura 6. Cachos de uva 'Itália' tratados com solução de quitosana a 2,0 % (B) e testemunha (A).

6.2.1.2 Tratamento pré-inoculação

Observando-se a Tabela 3, constata-se que os fatores intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação e tratamento (com ou sem quitosana) não exerceram influência significativa sobre o índice de doença causada por *B. cinerea*. De maneira geral, no decorrer dos dias de avaliação nota-se, embora não significativa, redução no índice de doença em cachos tratados com solução de quitosana 24 ou 48 h antes da inoculação com o patógeno, porém quando inoculados 72 ou 96 h após o tratamento, o índice de doença em cachos tratados foi maior do que nos não tratados com solução de quitosana.

Em maçãs, Capdeville et al. (2002) constataram o efeito positivo das concentrações de 1 e 2 % de quitosana no controle do mofo azul (*Penicillium expansum*), quando os frutos foram tratados 48 ou 96 h antes da inoculação. Em geral, o simples tratamento dos frutos com quitosana foi ligeiramente melhor ou igual ao tratamento com quitosana combinado com outros agentes (UV-C, harpina, *Candida saitoana*).

Ben-Shalom et al. (2003) obtiveram redução de 65 % na incidência de mofo cinzento (*B. cinerea*) em plantas de pepino tratadas com quitosana 1 h antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 3. Efeito da solução de quitosana (1,5 %), sobre o índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* após o tratamento e, armazenados a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
Dias de armazena/o	Trata/os	24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
2	Com Quitosana	8,00 ^y	4,67	6,50	5,00	6,04 a	ns
	Sem Quitosana	8,17	6,33	7,50	4,67	6,67 a	
	Média	8,08 A	5,50 A	7,00 A	4,83 A		
		ns					
C.V. (%)		64,45					
3	Com Quitosana	23,50	17,00	24,50	16,67	20,42 a	ns
	Sem Quitosana	24,17	19,83	23,67	14,50	20,54 a	
	Média	23,83 A	18,42 A	24,08 A	15,58 A		
		*					
C.V. (%)		50,20					
4	Com Quitosana	50,67	39,33	53,83	39,83	45,92 a	ns
	Sem Quitosana	56,00	46,00	52,17	36,50	47,67 a	
	Média	53,33 A	42,67 A	53,00 A	38,17 A		
		*					
C.V. (%)		40,77					

^y Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre índice de doença, n.s. = não significativo; *, ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Interação = ns, para todos os dias de armazenamento.

Conclusivamente, com base nos resultados obtidos nos dois ensaios, inoculação antes ou após o tratamento com quitosana, é possível inferir que a solução de quitosana teve maior efeito curativo do que protetor em uva 'Itália' contra *B. cinerea*, em vista de sua maior eficiência quando aplicada após a inoculação com o patógeno.

O Apêndice 17 apresenta os valores obtidos nas análises físicas e físico-químicas dos cachos de uva antes de serem submetidos aos tratamentos com a solução de quitosana a 1,5 % com o intuito de verificar se todos tinham as mesmas condições antes de receberem o tratamento, como se tivessem sido colhidos no momento do tratamento. Observa-se que pelo fato dos cachos terem sido mantidos sob refrigeração ($1\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR) até o momento da inoculação, estes não apresentaram diferenças na maioria das avaliações físicas e físico-químicas, sendo que os únicos parâmetros a mostrarem diferença significativa foram o pH e a cor das bagas. As diferenças significativas observadas nos valores de pH são tão ínfimas que seriam imperceptíveis ao paladar, além disso, não corresponde a alterações de acidez titulável, cujos valores não apresentaram diferenças significativas. Quanto à cor das bagas, os valores de L^* e Hue não mostram diferença significativa entre os cachos armazenados por diferentes momentos, enquanto o Croma indica que as bagas tratadas com quitosana 96 h antes da inoculação tornaram-se mais escuras com o armazenamento.

Após a colheita, normalmente, existem poucas mudanças na cor de bagas de uvas brancas, as quais são na realidade verde-amareladas devido à presença de carotenóides. Durante longo período de armazenamento, ou devido à abrasão, as bagas podem escurecer. Em uvas muito maduras, no caso da cultivar Itália é característico, após quatro a seis semanas de armazenamento as bagas adquirirem uma coloração levemente marrom, perdendo o seu valor comercial (GORGATTI NETTO et al., 1993). Por sua vez, a ráquis é altamente suscetível ao escurecimento e isto tem causado rápida perda de qualidade devido à aparência do cacho. Em ambos os casos, o escurecimento pode estar ligado à desidratação (LYDAKIS; AKED, 2003b).

Takeda et al. (1983) não verificaram mudanças nos valores de sólidos solúveis, acidez titulável, açúcares e pH em uvas ‘Muscadine’ armazenadas a 20, 4,5 e 0°C . Mas, as doenças aumentaram rapidamente nos frutos mantidos na maior temperatura.

Os Apêndices 18a e 18b apresentam os dados das características físicas e físico-químicas obtidos 24, 48, 72 ou 96 h após os tratamentos com quitosana, ou seja, no momento da inoculação com *B. cinerea*. Nota-se que os cachos tratados com quitosana apresentaram valores maiores de L^* (luminosidade), este fato justifica-se com base na Figura 6, onde visivelmente os cachos ficaram mais brilhantes. O parâmetro b^* da cor de

baga, tanto no momento da inoculação como no final do experimento (Apêndices 18a e 19a) mostra que cachos de uva tratados com quitosana tiveram menor alteração de cor que os não tratados, ou seja, a quitosana retardou a senescência dos cachos. As diferenças observadas em a^* , aparência da ráquis e pH no momento da inoculação deve-se ao fator intervalo de tempo entre tratamento e inoculação e não ao tratamento (com ou sem quitosana).

No final do experimento (Apêndices 19a e 19b), com exceção da diferença na cor de baga (b^*) já abordada anteriormente, todos os demais parâmetros mostraram-se semelhantes estatisticamente entre cachos tratados ou não com quitosana, independente do momento de tratamento.

6.2.2 Efeito da solução de quitosana *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

É sabido que quitosana interfere no crescimento de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *B. cinerea* (EL GHAOUTH et al., 1994). O crescimento micelial de *B. cinerea*, foi completamente inibido pelas concentrações de quitosana de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 % durante o período de incubação de cinco dias a $22\pm 1^\circ\text{C}$, enquanto que, no decorrer do experimento, notou-se que no meio acrescido de 0,25 % de quitosana o fungo *B. cinerea* formou colônias compactas com micélio aéreo crescendo verticalmente e, o mesmo patógeno crescendo em meio não acrescido de quitosana (testemunha) formou colônias amplas, as quais aderiram à superfície do meio (Figura 7). A mesma característica de crescimento foi observada para o patógeno *Mucor racemosus* crescido em meio suplementado com 1 g.L^{-1} de quitosana (ROLLER; COVILL, 1999) e, para *B. cinerea* e *R. stolonifer* crescidos nas concentrações de quitosana maiores que $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (EL GHAOUTH et al., 1992a). A diferença qualitativa na morfologia das colônias de *B. cinerea* crescidas com ou sem quitosana em meio BDA sugerem que o microrganismo procurou crescer longe da superfície na tentativa de evitar o contato direto com o efeito tóxico da quitosana. Com base nas observações deste e de outros trabalhos (ROLLER; COVILLI, 1999), pode-se inferir que a atividade antimicrobiana da quitosana contra fungos pode ser melhorada pelo maior contato entre a quitosana e o microrganismo ao qual pretende-se controlar.

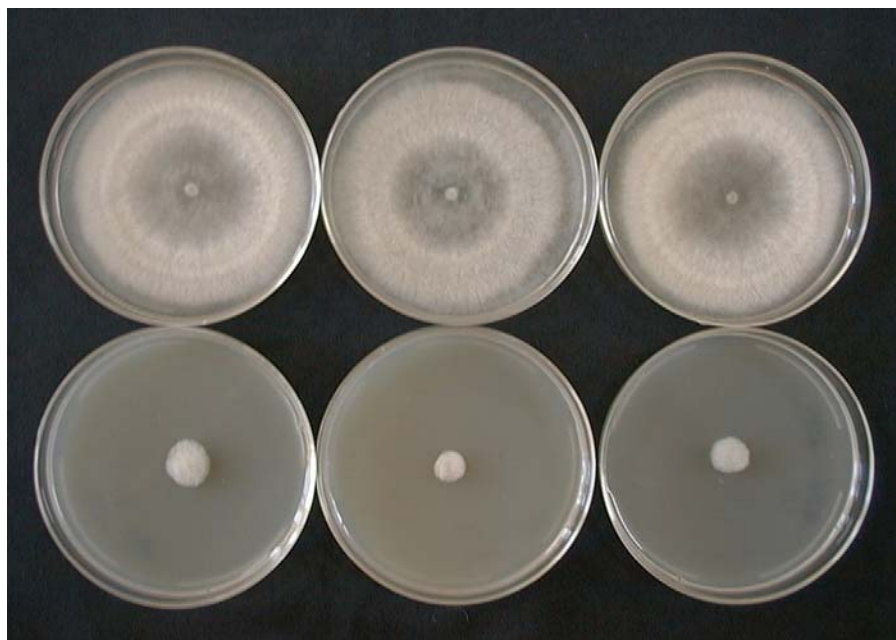


Figura 7. Crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em meio BDA, após cinco dias de incubação a $22\pm 1^\circ\text{C}$. Placas superiores, sem adição de quitosana e; placas inferiores, meio BDA acrescido de 0,25 % de quitosana.

Resultados obtidos por Roller e Covill (1999), onde meio de cultura acrescido de 2 g.L^{-1} de quitosana foi exposto a 121°C por 10, 15, 20, 25 ou 30 min, sugerem que a atividade antimicrobiana da quitosana não foi afetada pelo processo de autoclavagem do meio por até 30 min.

Quanto aos efeitos da quitosana na germinação dos conídios, notou-se que conídios suspensos apenas em água destilada esterilizada (testemunha) germinaram após 8 h de incubação a $22\pm 1^\circ\text{C}$. Por sua vez, conídios tratados com quitosana, independente da concentração, germinaram após 24 h (Apêndice 20). Embora sendo considerados germinados, pôde-se observar que os conídios submetidos à solução de quitosana apresentaram hifas atrofiadas, mais espessas e muitas vezes com ramificação excessiva (Figura 8).



Figura 8. Efeito da solução de quitosana na germinação de conídios de *Botrytis cinerea*, 24 h após o tratamento com 1,5 % de quitosana (A) e testemunha (B). Aumento de 20x.

Estudos mostram que sob concentração relativamente baixa (20-30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a quitosana causou inibição de 50 % na germinação de conídios de *B. cinerea* e, quase total inibição foi observada a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BEN-SHALOM et al., 2003). Assim como mostrado neste trabalho, Ben-Shalom et al. (2003) também observaram que a quitosana reduziu a elongação do tubo germinativo. Quitosana inibiu a germinação de macroconídios de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* e *F. solani* f. sp. *phaseoli* na concentração de 8 e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (KENDRA et al., 1989).

Quitosana inibiu a germinação de esporos e o crescimento micelial de *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Completa inibição, todavia, não foi obtida com a concentração de 6 mg.mL^{-1} , indicando que o modo de ação da quitosana é mais fungistático do que fungicida (EL GHAOUTH et al., 1992a). *R. stolonifer* mostrou-se mais sensível do que *B. cinerea* à quitosana e, concentrações maiores do que 1,5 mg.mL^{-1} induziram mudanças morfológicas em *R. stolonifer* caracterizadas pela excessiva ramificação das hifas, quando comparado à testemunha (EL GHAOUTH et al., 1992a), indicando que o efeito da quitosana pode variar com o fungo.

Quitosana a 2,0 e 3,0 % exerceu efeito fungicida contra *C. gloeosporioides*. Mudanças morfológicas nos conídios foram observadas com a concentração de 1,5 % de quitosana após 7 h de incubação (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003). Por sua vez, o exame do tecido de pimentões tratados com quitosana e inoculados com *B. cinerea* revelou

que as células do patógeno apresentavam vários graus de desorganização celular, desde vacuolização até completa desintegração do protoplasma (EL GHAOUTH et al., 1997).

Zygosaccharomyces bailii foi exposta a duas concentrações de quitosana (5,0 e 0,5 g.L⁻¹) sob temperatura ambiente para verificação de mudanças morfológicas. Na presença de 5,0 g.L⁻¹ de quitosana, a levedura apresentou evidências de plasmólise dentro dos primeiros 45 segundos de exposição à quitosana e este efeito permaneceu inalterado nos próximos 60 min. Quando exposta a 0,5 g.L⁻¹ de quitosana, similar reação foi observada, mas, após 10 min uma pequena proporção da levedura demonstrou reação de desplasmólise e retomou sua aparência normal. Isto evidencia que, sob baixas concentrações os efeitos antifúngicos da quitosana foram reversíveis (ROLLER; COVILL, 1999). De acordo com Hirano e Nagao, (1989), o aumento na concentração deste composto resulta em aumento no grau de inibição do crescimento de fitopatógenos.

A quitosana pode ligar-se ao DNA e a inibição da síntese de mRNA ocorrer via penetração do produto no núcleo do microrganismo, interferindo também com a síntese de proteínas (SHAHIDI et al., 1999). O mecanismo de inibição do crescimento de patógenos pela quitosana difere do mecanismo utilizado pelos fungicidas sintéticos (HIRANO; NAGAO, 1989). O crescimento micelial e a morfologia dos conídios neste e em outros trabalhos, com diferentes fungos, foram afetados pela quitosana, indicando que este produto atua em vários estádios de desenvolvimento dos patógenos, inclusive de *B. cinerea*.

Baseado nos resultados dos estudos *in vitro* e, no primeiro ensaio *in vivo*, inoculação seguida de tratamento com quitosana, ressalta-se a inibição do mofo cinzento em uva como função da propriedade fungistática da quitosana, sendo que suas propriedades eliciadoras requerem mais estudos.

O sucesso na aplicação de qualquer agente antimicrobiano na conservação de alimentos depende de inúmeros fatores. O adequado controle do crescimento microbiano em alimentos utilizando quitosana pode requerer um extenso conhecimento dos fatores que determinam a eficiência do produto, incluindo o efeito do pH, temperatura, patógeno, outros preservativos, composição do alimento, etc. (ROLLER; COVILL, 1999).

Jiang e Li (2001) sugerem que o tratamento com quitosana para controle de doenças pode ser viável em frutos armazenados por curtos períodos ou para o

transporte e distribuição a curtas distâncias. Porém, para longos períodos de armazenamento, a combinação de quitosana com uma dose parcial de fungicidas parece ser mais adequado.

Embora os resultados com a aplicação de quitosana em pós-colheita para o controle de *B. cinerea* em uva tenha apresentado resultados promissores, pela característica quiescente do patógeno e pelas desvantagens de se molhar os cachos na pós-colheita, novas pesquisas deverão juntar-se à de Romanazzi et al. (2002) para se avaliar o efeito da aplicação de quitosana no campo sobre o desenvolvimento do *B. cinerea* em pós-colheita de uvas de mesa, em escala comercial.

6.3 Ácido acético

6.3.1 Efeito da vaporização de ácido acético na proteção de uva ‘Itália’

6.3.1.1 Tratamento pós-inoculação

Os resultados de índice de doença obtidos no ensaio onde diferentes doses de ácido acético foram utilizadas para vaporização de cachos de uva previamente inoculados com *B. cinerea* constam na Tabela 4 e Apêndice 21. Nota-se que durante os dias de avaliação, todas as doses empregadas exerceram influência significativa na redução do índice de doença comparadas à testemunha. No segundo dia de armazenamento, além dos cachos vaporizados com ácido acético diferirem da testemunha, apresentando menor índice de doença, os tratamentos onde se empregou 5,2 e 21,0 mg.L⁻¹ diferiram significativamente entre si, com 4,5 % e 0,0 % de doença, respectivamente.

A redução ou simplesmente o atraso no desenvolvimento da doença quando os cachos foram submetidos ao vapor de ácido acético pode ser devido à sobrevivência de conídios dormentes de *B. cinerea* que normalmente germinam mais lentamente. Aharoni e Stadelbacher, em 1973, fizeram a mesma suposição para justificar o atraso no desenvolvimento de diversos patógenos submetidos ao vapor de acetalceído.

Tabela 4. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* e, após 4 h vaporizados com diferentes doses de ácido acético, armazenados por seis dias a $25\pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Dias de armazenamento				
	2	3	4	5	6
0,0	11,17* a	35,67 a	60,50 a	71,33 a	72,17 a
2,6	1,17 bc	4,00 b	13,33 b	15,83 b	18,50 b
5,2	4,50 b	12,33 b	20,83 b	27,50 b	28,67 b
10,5	1,33 bc	6,00 b	11,50 b	15,00 b	17,00 b
21,0	0,00 c	6,50 b	8,50 b	13,50 b	15,17 b
C.V. (%)	43,43	39,86	40,89	42,25	40,42

* Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra mnúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

Moyls et al. (1996) verificaram que a vaporização de cachos de uva com 8,0 mg.L⁻¹ de ácido acético, seguida do armazenamento por 74 dias a 0°C reduziu a porcentagem de podridão causada por *B. cinerea* de 94 % na testemunha para 2 %, sem qualquer sinal de fitotoxicidade. A fumigação com 2,0 ou 4,0 mg.L⁻¹ de ácido acético preveniu uvas, maçãs, kiwis, pêras e tomates inoculados com *B. cinerea* e, maçãs, laranjas e pêras inoculadas com *P. expansum* da deterioração (SHOLBERG; GAUNCE, 1995). Vapor de ácido acético a 1,4 ou 2,7 mg.L⁻¹ preveniu a deterioração de pêssegos por conídios de *Monilinia fructicola* ou *R. stolonifer*, respectivamente (SHOLBERG; GAUNCE, 1996).

Inicialmente os cachos apresentavam teores médios de sólidos solúveis de 14,3 °Brix, acidez titulável de 0,54 g de ácido tartárico.100 mL⁻¹ de suco e pH de 3,69. Ao final do quarto dia de armazenamento, todos os cachos, independente do tratamento apresentavam ráquis com coloração predominantemente marrom. Ainda, neste momento, os tratamentos não diferiram entre si quanto à cor das bagas (L*, a* e b*) (dados não apresentados). Sholberg et al. (1996), da mesma forma, não verificaram diferenças significativas nos parâmetros sólidos solúveis, acidez titulável, pH, cor das bagas e desidratação da ráquis, em uvas vaporizadas com ácido acético (0,18; 0,27 ou 0,60 %); pelo contrário, uvas vaporizadas tiveram menos podridão causada por *Botrytis* do que a

testemunha, sendo a vaporização com ácido acético tão eficiente quanto a fumigação com SO₂ aplicada em doses comerciais. Entretanto, o aumento na frequência de vaporização não aumentou a eficiência do tratamento.

De acordo com Sholberg et al. (1996) a vaporização com ácido acético não afeta negativamente a composição dos cachos quando comparados com o tratamento com SO₂, pelo contrário, previne o *flavor* desagradável por inibir significativamente a população de fungos e bactérias presentes na superfície das bagas, os quais produzem etanol e ácido acético (SHOLBERG et al., 1996).

Sholberg et al. (2000) afirmam que o ácido acético glacial foi aproximadamente 14 vezes mais eficiente do que o vinagre contendo 5 % de ácido acético, no controle de *P. expansum* em maçã e concluíram que o controle da doença foi proporcional ao conteúdo de ácido acético. Em vários trabalhos (SHOLBERG; GAUNCE, 1995; SHOLBERG 1998; SHOLBERG et al., 2001), os autores sugerem que o vapor de ácido acético inicialmente esteriliza a superfície dos frutos. Por sua vez, em 1995, Sholberg e Gaunce, mostraram que baixas concentrações de vapor de ácido acético no ar preveniram a germinação de conídios de *B. cinerea* e *P. expansum* e, evitaram a infecção de maçãs sem causar danos nos frutos. Da mesma forma, o vapor de vinagres contendo de 4,2 % a 6,0 % de ácido acético não causou qualquer sintoma de fitotoxicidade em diferentes frutos como maçã, pêssego, morango (SHOLBERG et al., 2000).

Embora não tendo sido observado sintomas de fitotoxicidade neste ensaio, assim como em vários outros frutos, uma das desvantagens do ácido acético é que, assim como outros ácidos orgânicos de cadeia curta, na forma de vapor pode ser extremamente fitotóxico (SHOLBERG, 1998). Por exemplo, o uso de ácido acético em pêssego e nectarina é limitado, uma vez que, à partir da concentração de 2,7 mg.L⁻¹ pode causar estrias escurecidas na superfície dos frutos (SHOLBERG; GAUNCE, 1996). Em bananas, o uso de altas concentrações de ácido acético (0,3 % e 0,4 %) resultaram em escurecimento e necrose na casca, a qual avançou até o surgimento de lesões de antracnose (PERERA; KARUNARATNE, 2001).

A hipótese de que o baixo pH proporcionado pelo tratamento com vapor de ácido acético seja a causa dos sintomas de fitotoxicidade (bronzamento) na casca de pêssegos, foi sugerida por Sholberg e Gaunce (1996). Sob condições de baixo pH, os cátions

são ionizados e ficam livres na água presente na superfície dos frutos, podendo entrar nos frutos através de áreas danificadas. Estes íons podem unir-se com antocianinas ou mais provavelmente com taninos, resultando no escurecimento dos tecidos. Isto mostra que frutos podem ser vaporizados com concentrações relativamente altas de ácido acético sem resultar em fitotoxicidade, mas para isso precisam estar secos e livres de condensação de água na superfície até que o ácido acético residual seja dissipado.

O controle das doenças, bem como a intensidade da fitotoxicidade, dependem de vários fatores, como: frequência de vaporização; concentração de ácido acético; quantidade de fruto; cultivar; umidade, temperatura e duração da fumigação (SHOLBERG et al., 2001).

Visto a eficiência de controle da doença no decorrer dos dias de avaliação obtida em todas as doses de vapor de ácido acético a que os cachos foram submetidos, optou-se por utilizar a dose de $10,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no segundo experimento (tratamento seguido de inoculação). Embora a dose de $21,0 \text{ mg.L}^{-1}$ tenha apresentado valores médios menores de índice de doença, é sabido que doses acima do ideal podem ser fitotóxicas, causar escurecimento da superfície de alguns frutos e, como ensaios prévios mostraram essa possibilidade na uva 'Itália' submetida a doses elevadas, optou-se por uma dose mais segura.

6.3.1.2 Tratamento pré-inoculação

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos de índice de doença em cachos de uva 'Itália' submetidos ao tratamento com vapor de ácido acético 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação com *B. cinerea*. Verifica-se que, no segundo e terceiro dias de armazenamento independente dos cachos terem sido vaporizados ou não com ácido acético, quando inoculados 48 e 72 h após a transferência para a condição de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR apresentaram índices de doença significativamente menores do que os vaporizados ou não e transferidos 24 e 96 h antes da inoculação. Ainda, independente do intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação, cachos de uva vaporizados com $10,5 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentaram índice de doença significativamente menor do que os não vaporizados. No quarto dia de avaliação, cachos de uva vaporizados 48 h antes da inoculação, apresentaram o menor índice de doença, diferindo significativamente dos cachos não vaporizados ou vaporizados 24 ou 96 h antes da inoculação com o patógeno.

Tabela 5. Efeito do vapor de ácido acético ($10,5 \text{ mg.L}^{-1}$), sobre o índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* após a vaporização e, armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Dias de armazena/o	Trata/os	Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
2	Com AA	11,67 ^y	3,67	7,33	14,17	9,21 b	**
	Sem AA	15,83	11,33	8,67	15,83	12,92 a	
	Média	13,75 A	7,50 B	7,80 B	15,00 A		**
C.V. (%)		29,98					
3	Com AA	33,33	12,33	22,50	36,17	26,08 b	*
	Sem AA	37,83	28,50	23,50	36,83	31,67 a	
	Média	35,58 A	20,42 B	23,00 B	36,50 A		**
C.V. (%)		21,90					
4	Com AA	50,67 ABa	22,50 Cb	34,83 BCa	54,67 Aa	40,67 a	**
	Sem AA	57,00 Aa	43,17 Aba	34,67 Ba	50,33 ABa	46,29 a	*
	Média	ns	Ns	**	ns		**
C.V. (%)		18,47					

^y Média de dez repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre o índice de doença, n.s. = não significativo; *, ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente. Interação = ns, ns e *, para 2, 3 e 4 dias de armazenamento, respectivamente.

A resposta dos cachos de uva 'Itália' à inoculação em diferentes momentos após a vaporização com ácido acético indica um gradual desenvolvimento de resistência contra *B. cinerea* alcançando o máximo a 48 h após a vaporização (Figura 9), seguido por um declínio, sugerindo que a indução de mecanismos de resistência não é permanente.

A necessidade de certo período de tempo (horas, dias) para que ocorra o acúmulo de fitoalexinas e desenvolvimento de resistência foi demonstrada por Langcake e Pryce já em 1977 em uva tratada com irradiação UV-C.

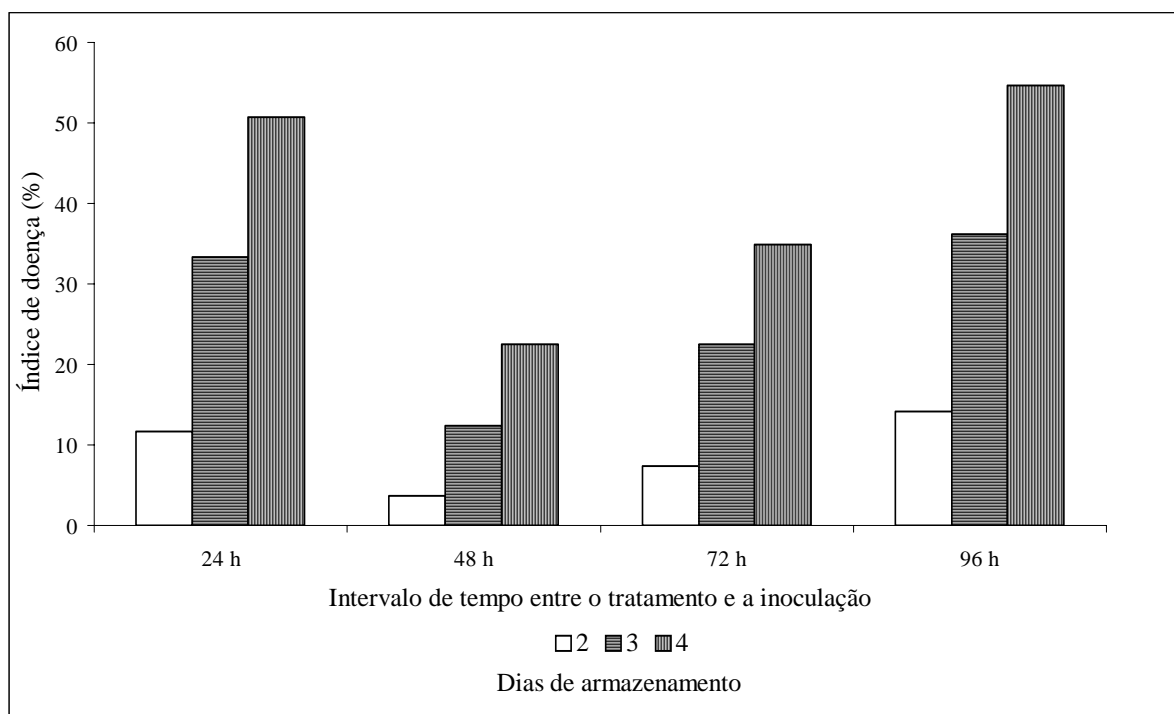


Figura 9. Efeito do vapor de ácido acético ($10,5 \text{ mg.L}^{-1}$), sobre o índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea* após a vaporização e, armazenados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Colletotrichum musae, o qual causa infecção quiescente em banana, quando inoculado 24 h após o tratamento com a combinação dos ácidos cítrico (0,025 %) e acético (0,1 %) com Benlate[®] (0,06 %), causou lesões menores nos frutos, indicando que o tratamento com ácidos na pós-colheita pode aumentar a resistência dos frutos, além disso, a quantidade de produto químico pôde ser reduzida pela metade. Como o patógeno não foi

exposto diretamente ao tratamento com os ácidos, o efeito direto do tratamento sobre o patógeno não foi a principal causa de redução da doença (PERERA; KARUNARATNE, 2001).

A possibilidade de indução de resistência através da vaporização dos cachos de uva com ácido acético glacial merece mais estudos. Os resultados obtidos neste ensaio, onde cachos tratados anteriormente à inoculação, principalmente 48 h antes da inoculação, mostraram resultados satisfatórios no controle da doença e apontam para a ativação de mecanismos de resistência nos tecidos, uma vez que, o patógeno não entrou em contato direto com o vapor de ácido acético. Ainda, com base nos resultados de ambos os ensaios *in vivo*, inoculação pré ou pós-tratamento, pode-se inferir que os mecanismos de inibição do patógeno foram: efeito direto do ácido acético sobre o crescimento do fungo e/ou aumento da resistência dos cachos de uva.

O Apêndice 22 apresenta os resultados das análises físicas e físico-químicas dos cachos de uva antes de serem submetidos à vaporização com ácido acético; sendo que neste momento as uvas não apresentaram diferença significativa nos parâmetros avaliados.

No momento da inoculação (Apêndices 23a e 23b), uvas tratadas com ácido acético, independente do tempo entre o tratamento e a inoculação, apresentaram menores valores de L^* , que corresponde à luminosidade das bagas. Embora estatisticamente significativo, os valores de L^* entre cachos vaporizados (43,73) ou não (44,56) ficaram muito próximos, provavelmente o coeficiente de variação muito baixo (2,46 %) seja o responsável pela diferença estatística, porém, na prática não é uma diferença a ser considerada. Nota-se que os valores de b^* elevaram-se com o aumento do tempo entre tratamento e inoculação, o que explica mudanças de tonalidade dos cachos de verde para amarelo, porém da mesma forma como para o parâmetro L^* esta diferença é pequena o bastante para não ser justificada na prática. A diferença significativa na coloração da ráquis deve-se ao intervalo de tempo entre o tratamento e a inoculação, onde os cachos que permaneceram mais tempo após o tratamento à espera da inoculação à 25°C apresentaram ráquis mais desidratada/escura, sendo que essa mesma tendência foi verificada ao final do experimento (Apêndice 24b). Quanto aos valores de pH, embora correspondendo às alterações de acidez titulável, e apresentando diferenças significativas, estas são tão ínfimas que seriam imperceptíveis ao paladar. O mesmo

é válido para as diferenças no valor de sólidos solúveis. Ao final do experimento, com exceção da coloração da ráquis, as demais análises não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Apêndices 24a e 24b).

6.3.2 Efeito do vapor de ácido acético *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

O vapor de ácido acético exerceu efeito direto sobre o crescimento micelial e na germinação de conídios de *B. cinerea*. Assim como em outros trabalhos (SHOLBERG; GAUNCE, 1995) o vapor de ácido acético matou todos os conídios deste patógeno.

Quando os conídios foram vaporizados, todas as doses proporcionaram redução de 100 % na germinação, com exceção da dose de 2,6 mg.L⁻¹, onde verificou-se pequena e desuniforme porcentagem de germinação, porém, aumentando-se o tempo de vaporização de 30 para 60 min, obteve-se redução de 100 % na germinação dos conídios. Neste sentido, Sholberg e colaboradores (2000) relataram que o número de lesões causadas por *P. expansum* em maçãs diminuiu exponencialmente com o aumento do tempo de fumigação com vinagres contendo diferentes concentrações de ácido acético. Entretanto, a fumigação com altas concentrações de vinagre por um curto período de tempo não foi eficiente em prevenir a infecção causada por *B. cinerea* em morangos.

Concentrações relativamente baixas de vapor de ácido acético tem muitas qualidades que o tornam um excelente biocida. Além de matar os esporos de vários fungos, não é inflamável nas concentrações empregadas para tal finalidade (SHOLBERG; GAUNCE, 1995).

A forma não dissociada do ácido acético é a principal responsável por sua atividade antimicrobiana. Isto se deve ao fato de moléculas não dissociadas deste composto terem a capacidade de passar através da membrana dos conídios presentes na superfície dos frutos e matá-los ou inativá-los por reduzir o pH do protoplasma celular (SHOLBERG et al., 2000).

Quanto ao efeito do vapor de ácido acético sobre o crescimento micelial de *B. cinerea*, os resultados são demonstrados na Figura 10, onde todas as doses reduziram significativamente o crescimento do fungo.

O etanol a 30 % reduziu a sobrevivência de conídios de *B. cinerea* e, 40 % inibiu completamente a germinação. Entretanto, o crescimento não foi reduzido significativamente após a exposição do micélio crescendo em BDA, às mesmas concentrações de etanol (LICHTER et al., 2002). Por esta razão, pode-se inferir que os conídios de *B. cinerea* apresentam-se como estruturas mais sensíveis do que o micélio a compostos voláteis, como por exemplo o ácido acético e o etanol. Dessa maneira, uma vez estabelecida a germinação dos conídios, esses produtos podem ser menos eficientes.

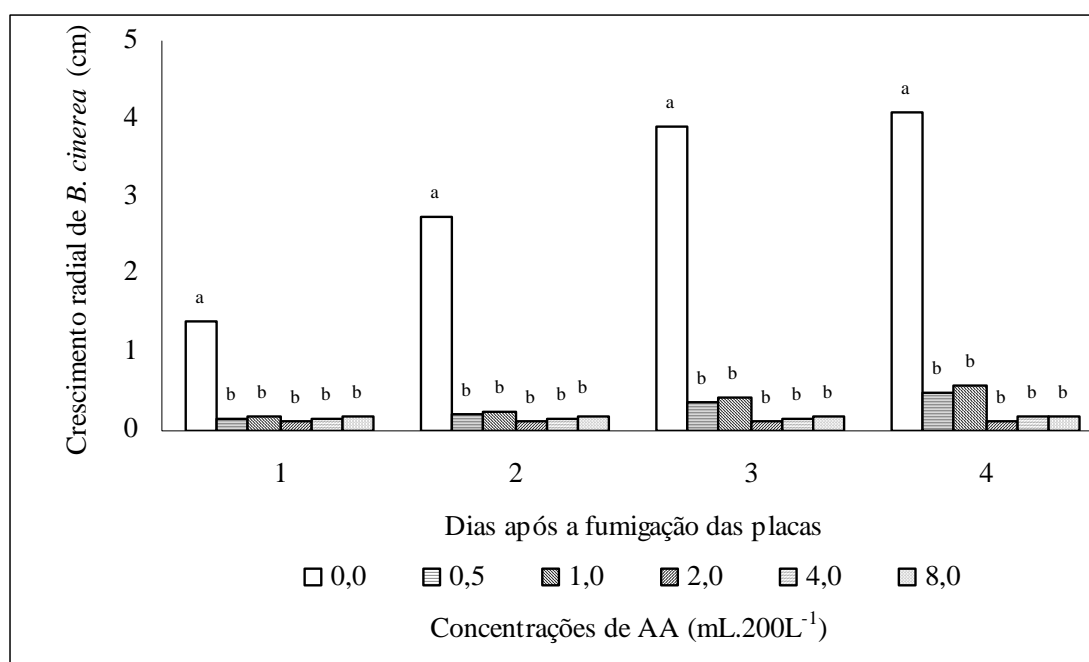


Figura 10. Efeito de diferentes concentrações de ácido acético (AA) sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Média de dez repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

O efeito fungitóxico do acetaldeído foi verificado por Avissar et al. (1990), onde a concentração de 0,7 % foi letal para conídios de *B. cinerea* e esporos de *R. stolonifer*, tendo as concentrações subletais inibido o crescimento do patógeno. Por sua vez, o vapor de ácido acético mostrou ser mais tóxico do que o acetaldeído aos conídios de *B.*

cinerea, sendo letal a 0,1 % v/v (SHOLBERG; GAUNCE, 1995). Outro exemplo, 2,0 % (39 mg.L⁻¹) de vapor de acetaldeído foi requerido para matar 50% de esporos de *R. stolonifer* em suspensão, comparado a 0,075 % (2,0 mg.L⁻¹) de vapor de ácido acético requerido para matar 100 % dos esporos presentes na superfície de pêssegos durante 30 min de vaporização (SHOLBERG; GAUNCE, 1996).

Ao contrário do SO₂, cujo limite de tolerância é de 10 µg.g⁻¹, pelo fato do ácido acético ser um constituinte natural dos alimentos, não há um limite determinado de ingestão diária pelas pessoas, segundo a “Food and Agriculture Organization” (FAO) (SHOLBERG et al., 1996). Portanto, o vapor de ácido acético é um potencial substituto ao SO₂ comumente utilizado no controle de podridões em pós-colheita de uvas de mesa, mantidas sob armazenamento refrigerado. O ácido acético provavelmente não deixa qualquer resíduo tóxico nas uvas, mas, métodos para monitorar a quantidade de vapor de ácido acético contido no ar, semelhantes àqueles utilizados para o SO₂ precisam ser desenvolvidos (SMILANICK; HENSON, 1992).

De acordo com Sholberg e Gaunce (1996), a fumigação com ácido acético tem potencial para o controle de doenças na pós-colheita se, infecções quiescentes forem controladas ainda no campo. Porém, como demonstrado neste e em outros trabalhos (PERERA; KARUNARATNE, 2001), a vaporização com compostos voláteis, particularmente ácido acético, apresenta-se como uma medida promissora para controle de infecções quiescentes na pós-colheita, possivelmente através da ativação de mecanismos de resistência no tecido dos frutos. Dessa forma, o uso do vapor de ácido acético é uma opção viável que pode complementar a eficiência de outros tratamentos em pós-colheita, principalmente quando métodos alternativos aos fungicidas sintéticos são requeridos (SHOLBERG et al., 2001). Cuidado especial deve ser tomado quando se utiliza ácido acético glacial, pois, além de apresentar odor caústico, pode queimar a pele e causar irritação dos olhos (LIU; CHU, 2002), por esta razão, o uso do vinagre é muito mais seguro e não deixa de ser eficiente (SHOLBERG et al., 2000).

6.4 Irradiação UV-C

6.4.1 Efeito da irradiação UV-C na proteção de uva 'Itália'

6.4.1.1 Tratamento pós-inoculação

As diferentes doses de irradiação UV-C aplicadas nos cachos de uva, após a inoculação com *B. cinerea*, não diferiram estatisticamente quanto ao índice de doença pelo teste de comparação de médias (Tukey $P \leq 0,05$) (Figuras 11 e 12). No entanto, quando os dados foram submetidos a análise de regressão polinomial, notou-se redução na ocorrência de mofo cinzento nos cachos tratados com UV-C comparativamente à testemunha, não sendo esta redução proporcional ao aumento da dose. Empregando-se o modelamento matemático sugerido por Bergamin Filho e Amorim (1996), o modelo logístico ($x = 1/(1+((1/x_0)-1)\exp(-rL.t))$), onde: x = proporção de doença, x_0 = inóculo inicial, rL = taxa de crescimento da doença e, t = tempo; foi o que melhor se ajustou aos dados de índice de doença (*in vivo*) e de crescimento micelial (*in vitro*).

Observando-se o Apêndice 25 (A e B), verifica-se em cachos inoculados 4 h antes da irradiação que, todas doses empregadas apresentaram algum nível de controle do patógeno, independente da data de avaliação. Esta redução no índice de doença pode ser função de mecanismos de resistência ativados pelas doses intermediárias, associados ao efeito direto sobre o inóculo que permaneceu na superfície dos ferimentos. A provável explicação para o aumento do índice de doença em frutos tratados com a dose de $4,8 \text{ kJ.m}^{-2}$ pode ser devido ao dano causado ao tecido das bagas, o qual pode ter anulado o efeito de indução de resistência e ao mesmo tempo favorecido o desenvolvimento do patógeno.

Nota-se pela Figura 12 que, apesar de submetidos a diferentes doses de UV-C, a doença nos cachos manteve uma taxa de crescimento (RL) aproximada, com a mesma *lag* fase, ou seja, a irradiação UV-C não foi capaz de alterar o padrão de desenvolvimento do patógeno (*in vivo*).

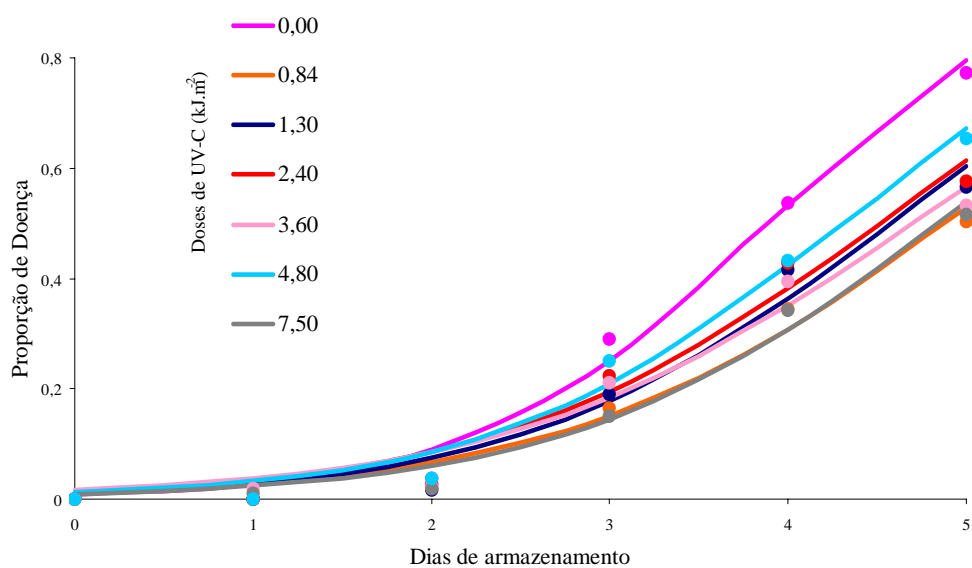


Figura 11. Proporção de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de irradiação UV-C, 4 h após a inoculação com o patógeno. Média de cinco repetições.

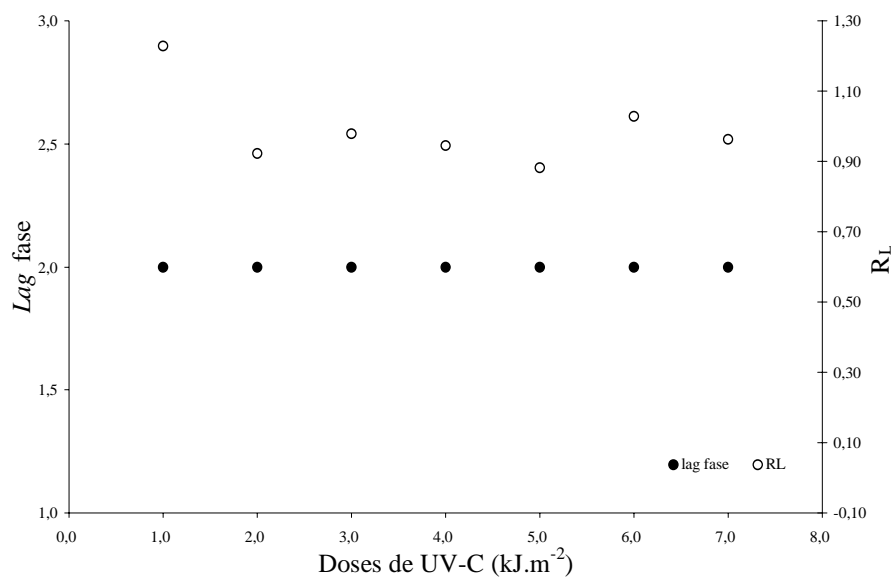


Figura 12. Lag fase e taxa de crescimento (R_L) de *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de irradiação UV-C, 4 h após a inoculação com o patógeno. Média de cinco repetições.

A descontaminação parcial da superfície dos frutos pela irradiação ultravioleta pode ser uma interessante prática, do ponto de vista de que, tecidos irradiados são submetidos a uma menor pressão de inóculo e em adição podem ser mais resistentes às doenças (MERCIER et al., 2001).

Embora a UV-C tenha exercido um forte efeito germicida *in vitro* sobre *B. cinerea* (Figura 17), matando muitos conídios expostos em ágar, a mesma mostrou-se ineficiente em prevenir a infecção nos cachos inoculados antes da irradiação. Provavelmente, suficiente quantidade de esporos presentes nos ferimentos podem ter sobrevivido ao tratamento e iniciado o processo de infecção, desde que a irradiação UV-C não é ionizante (LU et al., 1993), ou seja, incide superficialmente no tecido dos frutos.

Mercier et al. (2001) confirmaram o poder germicida da irradiação UV-C sobre conídios de *B. cinerea*, porém, assim como o relatado neste trabalho, a UV-C não preveniu a infecção de pimentão inoculados com o patógeno 24 h antes da exposição à irradiação. Todavia, pimentões submetidos ao tratamento 24 h antes da inoculação com o patógeno apresentaram menor porcentagem de infecção. Assim, a UV-C parece atuar como um mecanismo indutor de resistência em frutos às doenças, bem como, um agente sanitizante. Resultados similares foram obtidos por Ben-Yehoshua et al. (1992), os quais verificaram que a UV-C não controlou *Penicillium* sp. em citros inoculado 24 h ou imediatamente antes do tratamento com UV-C. Porém, a porcentagem de doença foi menor em frutos tratados antes da inoculação, sem o contato direto do patógeno com a irradiação. Assim como o suposto neste trabalho, os autores acima referidos sugerem que quantidade suficiente de esporos ou hifas podem ter sobrevivido ao tratamento nas lesões e iniciado as infecções; ainda, afirmam que a inoculação dos frutos antes do tratamento com UV-C ofereceu vantagens ao patógeno, enquanto os frutos irradiados antes da inoculação foram capazes de resistir à infecção (RODOV et al., 1992). Dessa forma, o resultado final da interação entre fruto e patógeno depende da taxa relativa de crescimento do fungo e do desenvolvimento de resistência no hospedeiro (RODOV et al., 1992; BEN-YEHOSHUA et al., 1992).

Os efeitos da UV-C causados ao tecido vegetal incluem dano ao DNA, peroxidação de lipídios, foto-oxidação de pigmentos e inibição da fotossíntese (STEVENS et al., 1998), ainda, doses altas de UV-C podem alterar a permeabilidade das

células, resultando em perda de eletrólitos, aminoácidos e carboidratos, os quais podem estimular o desenvolvimento de microrganismos (NIGRO et al., 1998).

Sabe-se que os microrganismos possuem mecanismos capazes de reparar os danos causados pela UV-C ao DNA, assim, a combinação de diferentes métodos de controle pode favorecer a inativação dos microrganismos (MARQUENIE et al., 2003). A combinação de tratamentos algumas vezes apresenta ação sinérgica, a qual diminui a intensidade requerida dos tratamentos individuais para alcançar determinado nível de inativação do patógeno. De acordo com Marquenie et al. (2002), *in vitro*, a combinação da irradiação UV-C com o tratamento térmico demandou menor intensidade de irradiação para inativação de conídios de *B. cinerea* e *Monilinia fructigena*. A maior dose de UV-C utilizada em combinação com o tratamento térmico foi dez vezes menor do que a dose requerida para inativação dos conídios de ambos os fungos quando somente a UV-C foi aplicada. Para *B. cinerea*, 3 min a 45°C seguido pela exposição a 0,05 J.cm⁻² resultou em completa inativação dos conídios, enquanto que, na seqüência inversa de tratamentos, foi necessária uma temperatura de 48°C. O efeito da seqüência do tratamento e a intensidade dependem do organismo, pois, ao contrário de *B. cinerea*, para *M. fructigena*, a maior inativação dos conídios deu-se quando o tratamento térmico foi seguinte ao tratamento com UV-C (MARQUENIE et al., 2002).

De acordo com Capdeville et al. (2002) a combinação de agentes como UV-C, quitosana, harpina, *Candida saitoana* não provocou qualquer efeito sinérgico no controle de *P. expansum* em maçãs. Além disso, a combinação destes agentes foi, de maneira geral, menos efetiva do que os tratamentos individuais.

Os dados obtidos neste experimento confirmam os obtidos previamente com pêssegos (STEVENS et al., 1998) e pimentões (MERCIER et al., 2001), onde doses de irradiação acima do ideal, consideradas doses horméticas, causaram redução na resistência dos frutos a *M. fructicola* e *B. cinerea*, respectivamente. Hormese é o estímulo de reações fisiológicas no organismo vivo, por baixas doses de um agente estressor, como UV, raio-X ou raio gama.

Quanto à dose de 7,5 kJ.m⁻², esta pode ter sido alta o bastante para, além de causar dano ao tecido, matar um número de esporos suficiente, a ponto de reduzir a doença nos cachos. Resultados similares foram obtidos por Liu et al. (1993) que obtiveram

controle de 46, 36 e 56 % em tomates inoculados com *B. cinerea* e tratados com 3,6; 4,8 e 7,5 kJ.m^{-2} , respectivamente.

6.4.1.2 Tratamento pré-inoculação

Nos cachos submetidos à irradiação UV-C 24 h antes da inoculação com o patógeno (Apêndice 26 A e B e Figuras 13 e 14), as doses de 0,84; 1,30; 2,40 e 3,60 kJ.m^{-2} , embora não diferindo estatisticamente da testemunha pelo teste de comparação de médias (Tukey $P \leq 0,05$), mostraram-se promissoras no controle do patógeno. Neste ensaio, o índice de doença verificado nas doses de 4,80 e 7,50 kJ.m^{-2} assemelharam-se comprovando as suposições feitas no ensaio anterior, onde a inoculação precedeu a irradiação pois, neste caso, as maiores doses podem ter lesionado o tecido dos frutos, mas não agiram diretamente sobre o patógeno. De maneira semelhante ao ensaio anterior, a *lag* fase foi igual para todas as doses empregadas, mas, desta vez a taxa de crescimento (R_L) alterou-se, confirmando a indução de resistência no tecido dos frutos submetidos às doses intermediárias. Como o fungo *B. cinerea* não entrou em contato direto com a irradiação, este estudo mostra conclusivamente que o agente de controle (UV-C) foi mais hábil em induzir resistência nos frutos do que meramente agir de maneira direta sobre o patógeno.

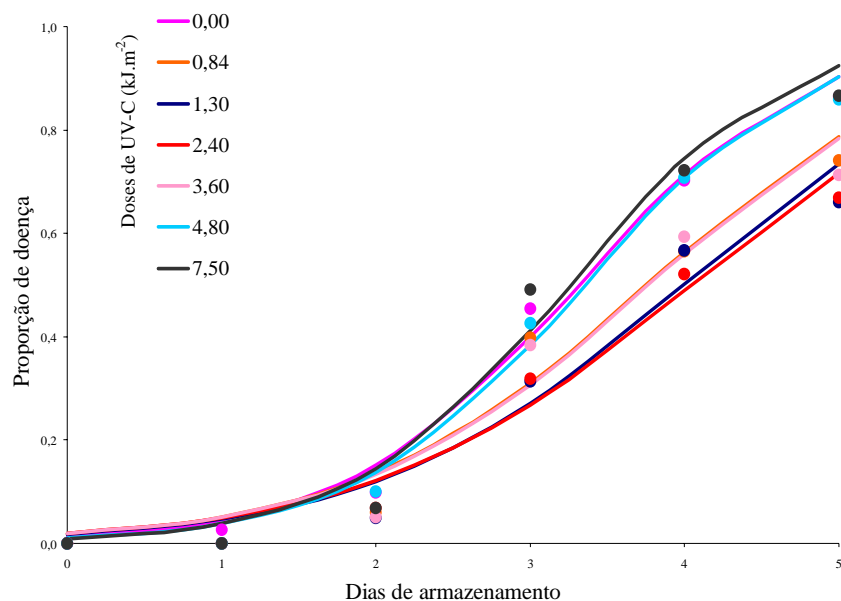


Figura 13. Proporção de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de irradiação UV-C, 24 h antes da inoculação com o patógeno. Média de cinco repetições.

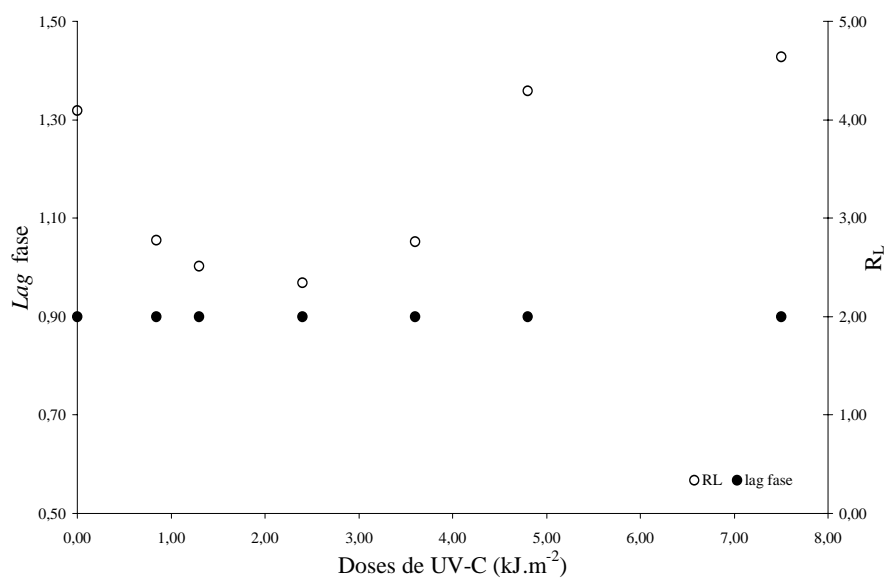


Figura 14. Lag fase e taxa de crescimento (R_L) de *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de irradiação UV-C, 24 h antes da inoculação com o patógeno. Média de cinco repetições.

O propósito de doses menores em reduzir o índice de doença é explicado pelo efeito hormético da UV-C, onde baixas doses, além de exercer efeito germicida atuam induzindo resistência no hospedeiro. Dessa forma, numerosos estudos suportam a idéia de que irradiação hormese em plantas altera processos fisiológicos como, respiração, germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento e induz resistência a doenças. Doses de irradiação acima do ponto ótimo podem resultar em aumento da doença e redução da resistência nos frutos em pós-colheita (LIU et al., 1993; STEVENS et al., 1996; STEVENS et al., 1998).

A irradiação UV-C efetivamente reduziu o número de bagas infectadas e o diâmetro da lesão causada por *B. cinerea* em uva 'Itália' irradiada com doses variando de 0,125 a 0,5 kJ.m⁻², antes ou após a inoculação com o patógeno, porém, o aumento da dose até 4,0 kJ.m⁻² resultou em aumento na doença (NIGRO et al., 1998). A redução no número de bagas infectadas e no diâmetro das lesões, observada em bagas inoculadas 24 e 48 h após a irradiação foi atribuída a ativação de mecanismos de resistência induzidos pela UV-C; porém, o aumento do tempo entre o tratamento e a inoculação resultou em aumento na doença, particularmente no diâmetro das lesões. Provavelmente isto se deva ao declínio na resistência induzida pela UV-C, sugerindo que o efeito do tratamento com a irradiação seja temporário (NIGRO et al., 1998). Ben-Yehoshua et al. (1992) também apontam o efeito temporário da irradiação UV-C no controle de *P. digitatum* em citros.

Doses elevadas, além de reduzir a resistência dos frutos e causar alterações fisiológicas, podem resultar em danos visíveis como manchas na epiderme dos frutos (HADWIGER; SCHWOCHAU, 1971; STEVENS et al., 1998; BEN-YEHOSHUA et al. 1992; NIGRO et al., 1998). Estudos feitos com pomelos demonstram que o emprego de doses superiores às requeridas para o melhor nível de controle de *P. digitatum*, resultaram em maior porcentagem de infecção e ocasionaram manchas e enrugamento na casca, como resultado do tratamento (DROBY et al., 1993). Frutos cítricos submetidos à irradiação UV-C apresentaram diferentes níveis de bronzeamento na casca, sendo que a extensão do dano dependeu da dose de irradiação utilizada, do estágio de maturidade e cor da casca, cultivar utilizada e data de colheita (BEN-YEHOSHUA et al., 1992; D'HALLEWIN et al., 1999). Nestes trabalhos, os sintomas de dano surgiram de 2 a 5 semanas após o tratamento. Em limões, os danos visíveis

ocasionados pela UV-C desenvolveram-se gradualmente e, os frutos foram tomados pelo patógeno (*P. digitatum*); quando verdes, os sintomas expressaram-se à partir da dose de 1,3 kJ.m⁻² (BEN-YEHOSHUA et al., 1992).

Os danos devido à aplicação de irradiação UV-C ocorreram em todas as doses empregadas, caracterizados por bronzeamento da epiderme das bagas (Figura 15). O dano foi mais evidente quanto maior a dose utilizada e teve início um dia após os tratamentos evoluindo durante o armazenamento a 25±1°C / 80-90 % UR. De acordo com Nigro et al. (1998), também uva 'Itália', a irradiação ultravioleta causou danos nas bagas a partir de 1,0 kJ.m⁻², caracterizado pelo bronzeamento ou descoloração da epiderme. De maneira semelhante aos dados apresentados neste trabalho, o aumento da dose resultou em aumento na severidade do dano e, os sintomas surgiram 3-4 e 7-10 dias após o tratamento com UV-C em bagas armazenadas a 21 ou 3°C, respectivamente

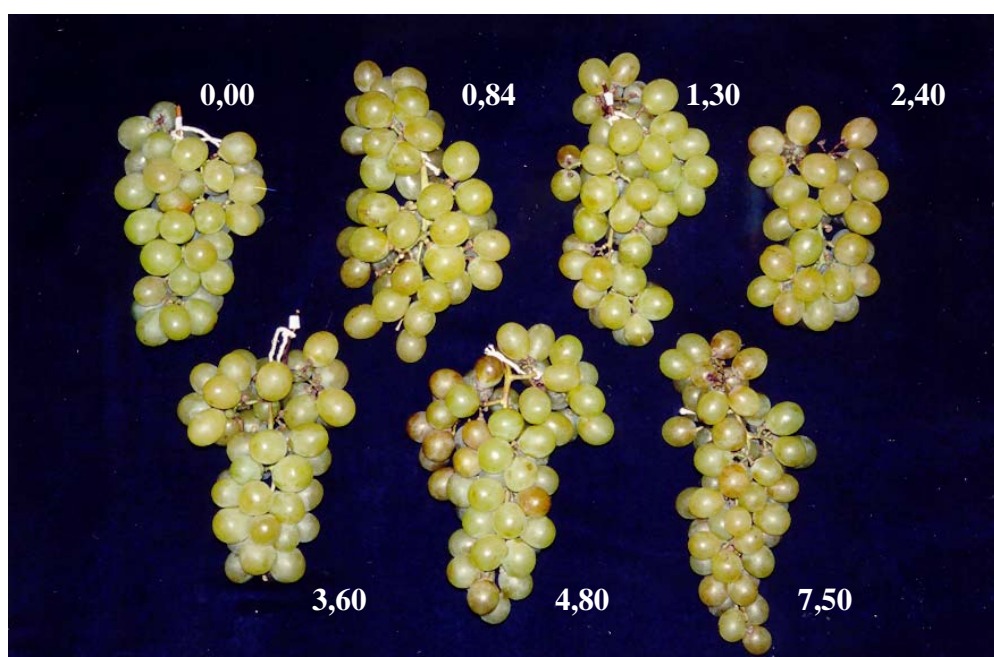


Figura 15. Cachos de uva 'Itália' 72 h após o tratamento com diferentes doses de irradiação UV-C (kJ.m⁻²).

O efeito da irradiação UV-C nos tecidos de bagas de uva verde foi correlacionado com o aumento na produção de fitoalexinas do tipo estilbenos (LANGCAKE; PRYCE, 1977). Entre estas substâncias, resveratrol foi sintetizada na epiderme e sugerida ser

o fator de resistência de bagas à invasão por *B. cinerea*. Embora a produção de resveratrol dependa de muitos fatores (CREASY; COFFEE, 1988), seu possível envolvimento na redução de podridão causada por *Botrytis* durante o armazenamento de uva não deve ser excluído, uma vez que, sua presença foi constatada em variedades de uvas de mesa atacadas por *R. stolonifer* (SARIG et al., 1996).

Embora Nigro et al. (1998) tenham obtido resultados satisfatórios com o emprego de baixas doses de irradiação UV-C em uva 'Itália', testes posteriores, empregando-se doses menores que as utilizadas nos ensaios acima descritos, mostraram que sob tais doses (0,20; 0,40 e 0,60 kJ.m⁻²), os cachos de uva 'Itália' apresentaram bronzeamento da epiderme, além destas não promoverem o controle do patógeno (dados não apresentados). Talvez isto se justifique pelo fato de que os frutos respondem de maneira diferente dependendo do estágio de maturidade, cor da casca, data de colheita, etc., de acordo com o descrito por Ben-Yehoshua et al. (1992) e D'Hallewin et al. (1999).

Em ambos os ensaios, inoculação antes ou após a irradiação UV-C, o aumento da dose não resultou em qualquer controle adicional à doença. Isto sugere que o principal mecanismo envolvido seja a indução de resistência.

6.4.1.3 Contagem dos conídios de *Botrytis cinerea* em bagas de uva irradiadas com UV-C

Caldari Júnior e Kimati (1999), estudando a influência de comprimentos de onda sobre a esporulação de dez isolados de *B. cinerea*, verificaram que um único isolado (B7) apresentou esporulação em todos os tratamentos, quando mantido no escuro. Os autores afirmam que este fato é passível de acontecimento nessa espécie de fungo, que pode apresentar alguma esporulação quando mantido em ausência de luz. De maneira semelhante, Thomas e Marois (1988) e Souza e Ferreira (1999) obtiveram inóculo de *B. cinerea* a partir de culturas do fungo desenvolvidas sob condições de ausência de luz. Como *in vitro*, as condições podem ser totalmente controladas, o patossistema natural uva-*Botrytis* pode ser ainda mais vulnerável a mudanças.

Neste sentido, notou-se que, quando os cachos foram inoculados após a exposição à irradiação UV-C não houve diferença significativa entre os tratamentos, apenas

uma tendência de redução na esporulação nas doses menores, possivelmente pela ativação, nos tecidos dos frutos, de substâncias ligadas à resistência. Todavia, quando inoculados antes do tratamento com UV-C, a dose de $7,5 \text{ kJ.m}^{-2}$ reduziu a esporulação do fungo comparada à testemunha (não irradiada) (Figura 16). Esses dados vêm ao encontro das suposições feitas nos ensaios *in vivo*, onde baixas doses aplicadas antes da inoculação estariam induzindo resistência no tecido dos cachos e, quando aplicadas após a inoculação, além da indução de resistência, poderiam agir diretamente sobre o patógeno. Isto indica uma redução da capacidade de esporulação do patógeno quando os cachos foram tratados com UV-C, comparados à testemunha.

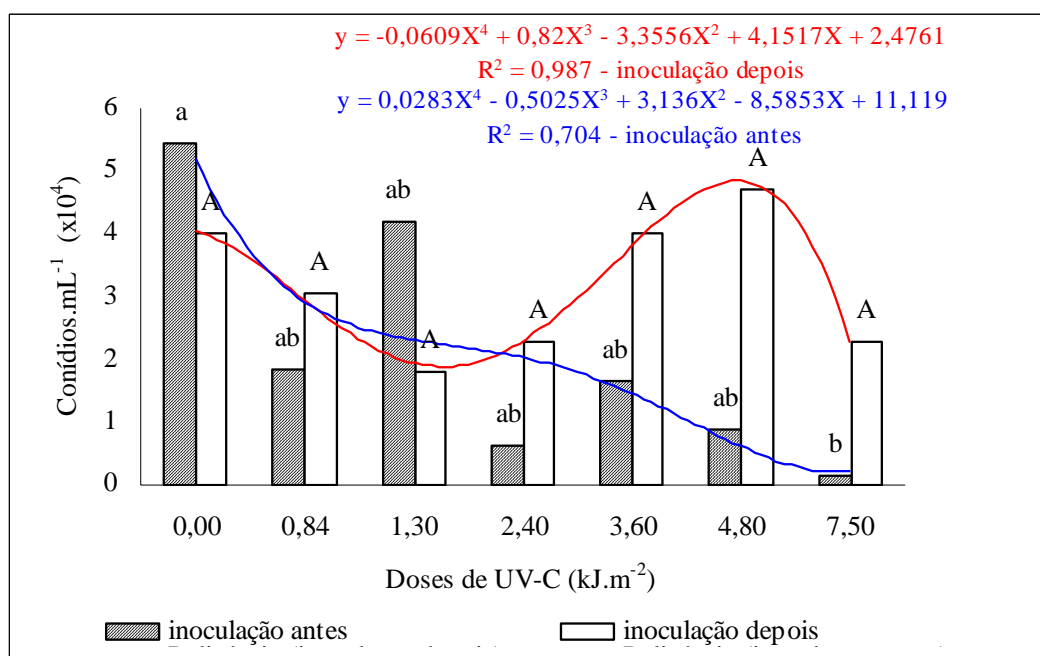


Figura 16. Efeito da irradiação UV-C sobre a produção de conídios de *Botrytis cinerea*, cinco dias após a inoculação em cachos de uva 'Itália'. Médias de três repetições seguidas de mesma letra minúscula para inoculação antes e maiúscula para inoculação depois não diferem significativamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$). Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise estatística.

De acordo com Jagger (1967), citado por Stevens et al. (1998), pelo fato da irradiação UV-C não ser ionizante (LU et al., 1993) e incidir apenas superficialmente no tecido do hospedeiro, seu efeito pode ser germicida. Todavia, pesquisas sobre os efeitos da UV-C na redução de podridões de armazenamento indicam sua capacidade em induzir

resistência no tecido do hospedeiro, como relatado por Lu et al. (1991), onde as doses de 20.10^4 erg.mm² e $7,5.10^4$ erg.mm² aplicadas em pêssego e maçã, respectivamente, estimularam a atividade de enzimas lignificantes, além de aumentar a atividade da fenilalanina amônia-liase. Capdeville et al. (2002) também verificaram o efeito indireto da irradiação UV-C ($7,5$ kJ.m⁻²) na prevenção e no atraso do surgimento de lesões causadas por *P. expansum* em maçã, onde os frutos foram desafiados com o patógeno 24, 48 ou 96 h após o tratamento. Concluíram que a UV-C induziu resistência dentro das primeiras 24 h seguinte ao tratamento, embora o maior controle tenha sido alcançado quando os frutos foram submetidos à irradiação 48 ou 96 h antes da inoculação. Além destes trabalhos, outros também mostram a possível ativação de mecanismos de resistência no tecido de frutos tratados com irradiação UV-C.

Assim sendo, novas pesquisas deverão ser conduzidas com o objetivo de explorar melhor a tecnologia da irradiação UV-C, uma vez que esta tem mostrado resultados satisfatórios em outros trabalhos. Talvez não só o uso da UV-C isoladamente, mas uma combinação com outros métodos de controle do mofo cinzento possam trazer bons resultados.

6.4.2 Efeito da irradiação UV-C *in vitro* na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Botrytis cinerea*

Nos testes *in vitro*, a porcentagem de germinação dos conídios, irradiados com diferentes doses de UV-C, foi inferior à testemunha em todas as doses empregadas. Quando submetidos à dose de $0,2$ kJ.m⁻² a germinação foi retardada, sendo considerados germinados após 32 h (88,5 %) de tratados com a UV-C, enquanto que na testemunha a germinação ocorreu após 24 h (95,3 %). Nos tratamentos onde utilizou-se doses de $0,4$ e $0,6$ kJ.m⁻² observou-se pequena porcentagem de germinação, 26,4 e 1,0 %, respectivamente, 56 h após a irradiação (Figura 17). Doses maiores ou igual a $0,84$ kJ.m⁻² exerceram efeito germicida sobre os conídios de *B. cinerea*, os quais não foram capazes de germinar mesmo após 56 h de submetidos à irradiação UV-C. Estes dados assemelham-se aos obtidos por Mercier et al. (2001), onde doses de UV-C de $2,2$ e $4,4$ kJ.m⁻² mataram os conídios de *B. cinerea* e, pequena proporção (14 %) sobreviveu ao tratamento com $0,88$ kJ.m⁻². De

acordo com Marquenie et al. (2002), a inativação de conídios de *B. cinerea* e *M. fructigena* aumentou com o aumento na intensidade de irradiação UV-C utilizada e, nenhuma sobrevivência foi observada em doses de 1,0 e 0,5 J.cm⁻², para ambos os fungos, respectivamente.

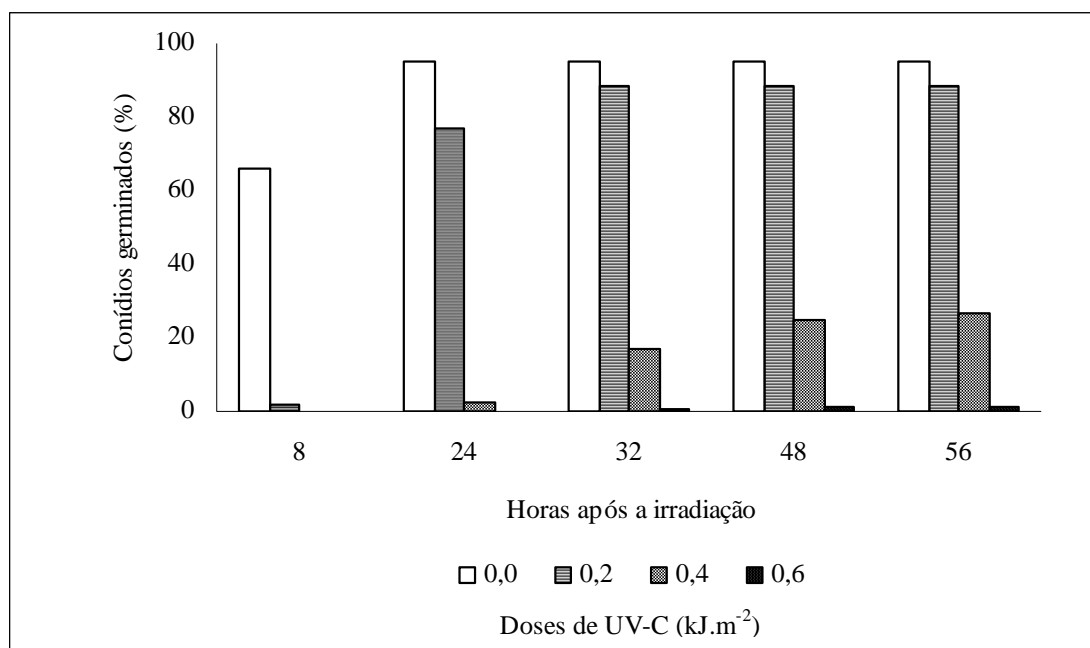


Figura 17. Efeito da irradiação UV-C sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*. Média de cinco repetições.

A avaliação do efeito da irradiação UV-C sobre o crescimento micelial de *B. cinerea* revelou que, assim como no teste de germinação dos conídios, a irradiação foi capaz de retardar o crescimento das colônias, porém, as hifas apresentaram-se menos sensíveis aos efeitos da UV-C, uma vez que, embora o crescimento tenha sido reduzido com o aumento da dose empregada, nenhuma das doses mostrou efeito fungicida sobre o micélio do patógeno. Provavelmente, o efeito germicida da UV-C somente foi evidente sobre a germinação dos conídios, por estas serem estruturas mais sensíveis à irradiação quando comparados às hifas.

Pode-se verificar nos tratamentos onde empregou-se doses maiores de UV-C, que houve um atraso no desenvolvimento inicial das colônias, a *lag* fase se estendeu, porém, com o passar do tempo estas colônias ganharam velocidade de crescimento e atingiram

a fase exponencial (*log fase*) (Figura 18). Por sua vez, a Figura 19, confirma o efeito da UV-C sobre a *lag* fase de crescimento do patógeno e revela a mesma taxa de crescimento (R_L), independente da dose empregada. Isso demonstra que a UV-C tem ação fungistática e não fungicida sobre o micélio de *B. cinerea*.

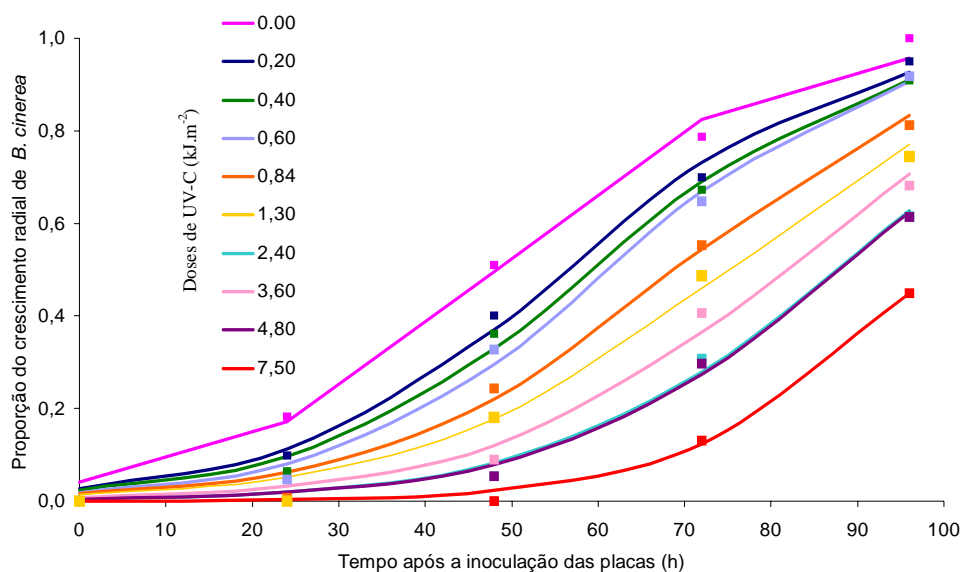


Figura 18. Efeito de diferentes doses de irradiação UV-C sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*. Média de cinco repetições.

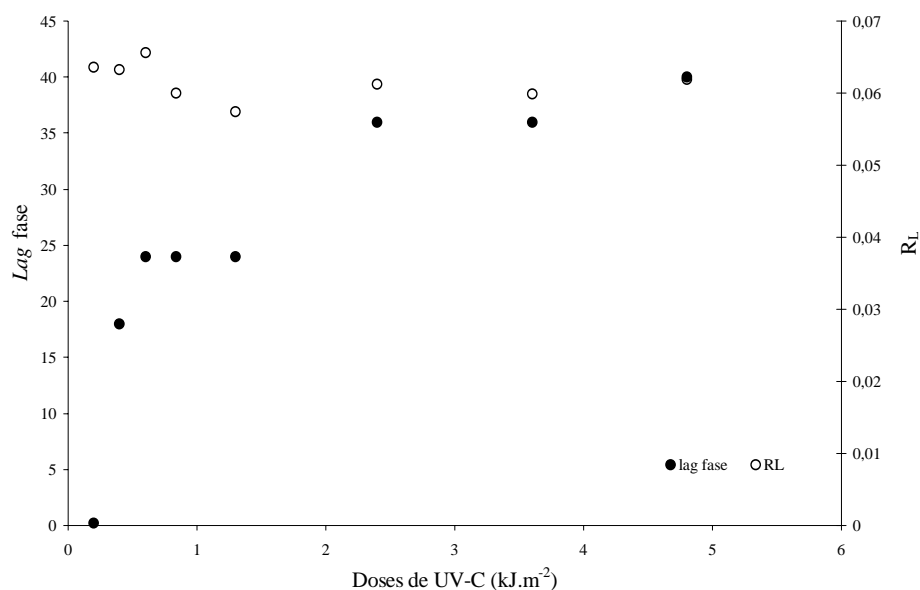


Figura 19. *Lag* fase e taxa de crescimento (R_L) de colônias de *B. cinerea* submetidas a diferentes doses de irradiação UV-C. Média de cinco repetições.

O controle das podridões em frutos pelo uso da irradiação UV-C é uma interessante alternativa visando reduzir os resíduos de fungicidas, porém, os danos fisiológicos causados nos frutos podem limitar sua possível utilização em escala comercial como uma nova alternativa de controle das doenças em pós-colheita.

De modo geral, dos agentes testados, quitosana e vapor de ácido acético mostram-se os mais promissores, merecendo continuidade nas pesquisas e investigações quanto à indução de mecanismos de resistência para proteção de uvas pós-colheita.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Extratos dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*, não controlam a podridão causada por *B. cinerea* em cachos de uva 'Itália', quando aplicados após a inoculação. Enquanto o extrato de *A. blazei*, à 5,0 %, aplicado 96 h antes da inoculação das uvas com *B. cinerea*, reduz levemente a severidade da podridão, embora não significativo estatisticamente. *In vitro*, ambos os extratos dos basidiocarpos estimularam a germinação dos conídios de *B. cinerea* nas concentrações testadas; quanto ao crescimento micelial, *L. edodes* retarda, enquanto *A. blazei* estimula.

- ✓ Solução de quitosana nas concentrações de 1,5 e 2,0 % controla a podridão causada por *B. cinerea* em uva 'Itália', quando aplicada após a inoculação. Entretanto, quando aplicada antes da inoculação com *B. cinerea*, quitosana (1,5%) não reduziu significativamente a severidade da podridão em uva 'Itália'. *In vitro*, quitosana suprime o crescimento micelial do patógeno e retarda a germinação dos conídios.

- ✓ O vapor de ácido acético controla a podridão de *B. cinerea* em uva 'Itália', tanto em cachos previamente inoculados, como, em cachos inoculados após o tratamento, principalmente a

48h. *In vitro*, o ácido acético exerce efeito direto sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de *B. cinerea*.

✓ A irradiação UV-C reduz o desenvolvimento de *B. cinerea* nos cachos de uva, nas menores doses aplicadas (0,84; 1,30; 2,40 e 3,60 kJ.m⁻²), porém, não de modo significativo. Contudo, acarreta bronzeamento nos cachos de uva 'Itália'. *In vitro*, assim como no teste de germinação dos conídios, a UV-C apresenta efeito de retardar o crescimento das colônias do patógeno.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, A.; LIZANA, L. A. Madurez de cosecha en uva cultivar Thompson seedless. II. Aceptabilidad sensorial en relacion a los indices solidos solubles y relacion solidos solubles/acidez. **Simiente**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p. 42-48, 1987.

ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N. F. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: KADER, A. A. (ed.). **Postharvest technology of horticultural crops**. 3. ed. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, 2002. p. 163-195.

AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 12, p. 1061-1069, 2002.

AGRIANUAL 2003: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2003. 544 p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4. ed. London: Academic Press, 1997. 635 p.

AHARONI, Y.; STADELBACHER, G. J. The toxicity of acetaldehyde vapors to postharvest pathogens of fruits and vegetables. **Phytopathology**, St Paul, v. 63, n. 4, p. 544-545, 1973.

AL-BACHIR, M. Use of gamma-irradiation and sulphur dioxide to improve storability of two Syrian grape cultivars (*Vitis vinifera*). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 521-526, 1998.

ALVAREZ, A. M.; VARGAS, B. V. Efecto de fungicidas aplicados en precosecha y SO₂ en postcosecha en el control de *Botrytis cinerea* Pers. en uva almacenada cv. Sultanina. **Agricultura Tecnica**, Santiago, v. 43, n. 1, p. 61-66, 1983.

AMARO, A. A. Mercado de uva de mesa. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradas. Viticultura e enologia: atualizando conceitos: **Anais...** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. p. 83-110.

ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 401-405, 2000.

ARCHBOLD, D. D. et al. Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry, and grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 10, p. 4032-4037, 1997.

ARVANITOYANNIS, I. S.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 371-382, 1998.

ASSIS, J. S.; LIMA FILHO, J. M. P. Aspectos fisiológicos da videira irrigada. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 129-145.

ASOCIACION DE EXPORTADORES DE CHILE. **Fruta fresca chilena de exportacion: uva de mesa: manual de productos.** Santiago, 1997. p. 2-13.

AUGER, S. J. Efecto de bajas concentraciones de anhídrido sulfuroso en el control de *Botrytis* en post-cosecha de uva de mesa y niveles de residuo con respecto a la tolerancia por el mercado norteamericano. In: _____. **Manejo de plagas y enfermedades en frutales y uva de mesa**, Santiago: Universidad de Chile, 1989. p.139-145 (Publicaciones Mescelaneas Agricolas, n. 30)

AVISSAR, I.; DROBY, S.; PESIS, E. Characterization of acetaldehyde effects on *Rhizopus stolonifer* and *Botrytis cinerea*. **Annual Apply Biology**, Warwick, v. 116, n. 2, p. 213-220, 1990.

BARALDI, E. et al. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and cold stored kiwi fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 11-12, p. 629-635, 2002.

BARKAI-GOLAN, R. Postharvest disease suppression by atmosphere modifications. In: CALDERON, M.; BARKAI-GOLAN, R. **Food Preservation by Modified Atmospheres**. Florida: Boca Raton. 1990. p. 237-264.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis: Burgess Publishing company, 1972. 241 p.

BASOALTO, V. V. **Efecto de fungicidas aplicados en precosecha y SO₂ en postcosecha en el controle de *Botrytis cinerea* Pers. En vid (*Vitis vinifera* L.) cv. *Sultanina***. Quillota, 1979. 80 p. (Trabalho de Graduação) – Universidad Catolica de Valparaiso.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.

BENATO, E. A. et al. Controle de doenças pós-colheita de uva 'Itália' e avaliação dos níveis residuais de SO₂ e thiabendazol. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.1, n.1-2, p.107-112, 1998.

BENATO, E. A. Cuidados na colheita, manuseio e conservação de uva de mesa. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradas. Viticultura e enologia: atualizando conceitos: **Anais...** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002. p. 121-135.

BENATO, E. A. Tecnologia, fisiologia e doenças pós-colheita de uvas de mesa. In: POMMER, C. V. (Ed.). Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003a. p. 635-723.

BENATO, E. A. Potencial de indução de resistência em frutas pós-colheita. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2003b. p. 215-220.

BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 285-290, 2003.

BEN-YEHOSHUA, S. et al. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 7, p. 1217-1221, 1992.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. A epidemiologia clássica: conceitos básicos. In: _____. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ceres, 1996. p. 73-97.

BIANCO, C. Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. **Bacterial and Viral Immunology**, v.75, n. 2, p.267-274, 1981.

BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 167-175, 2001.

BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n.10, p.883-894, 1990.

BREUIL, A. C. et al. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a resveratrol dehydrotimer. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 537-540, 1998.

BROOME, J. C. et al. Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. **Phytopathology**, St Paul, v. 85, n. 1, p. 97-102, 1995.

BULIT, J.; DUBOS, B. Botrytis bunch rot and blight. In: PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1990. p. 13-15.

BUTLER, B. L. et al. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 953-955, 1996.

CALDARI JÚNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CALDARI JÚNIOR, P.; KIMATI, H. Influência de comprimentos de onda na esporulação *in vitro* de isolados de *Botrytis cinerea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 459-462, 1999.

CAPDEVILLE, G. et al. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 8, p. 900-908, 2002.

CARDOSO FILHO, J. A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acibenzolar-S-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARVAJAL-MILLÁN, E. et al. Polyphenol oxidase activity, color changes, and dehydration in table grape rachis during development and storage as affected by *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N*-phenylurea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 2, p. 946-951, 2001.

CARVALHO, R. L. et al. **Análises químicas de alimentos**, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1990. 121 p. (Manual Técnico).

CARVALHO, V. D.; CHITARRA, M. I. F. Aspectos qualitativos da uva. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 10, n. 117, p. 75-79, 1984.

CATALUÑA, E. Pragas e doenças. In. _____. **As uvas e os vinhos**. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo: Globo, 1991. p. 47-52.

CHAMBERS, K. R. Benzyl alcohol as an inhibitor of the development of *Botrytis cinerea* *in vitro* and in packed grapes during storage. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 4, p. 265-268, 1990.

CHARDONNET, C. O. et al. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. **Phytopathology**, St Paul, v. 90, n. 7, p. 769-774, 2000.

CHOUDHURY, M. M Colheita, manuseio pós-colheita e qualidade mercadológica de uvas de mesa. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 347-368.

COERTZE, S.; HOLZ, G.; SADIE, A. Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, n. 6, p. 668-677, 2001.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, R.; RUSSEL, P.E.; SISLER, H.D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, 1996. p. 461-466.

COMMÉNIL, P.; BRUNET, L.; AUDRAN, J. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 313, p. 1599-1607, 1997.

COMMÉNIL, P. et al. Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 37-43, 1999.

CREASY, L. L.; COFFEE, M. Phytoalexin production potential of grape berries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 230-234, 1988.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, n. 5, p. 315-327, 1995a.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of reduced penetration of *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induced systemic resistance and its relation to enhanced

peroxidase and chitinase activities. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, n. 5, p. 329-338, 1995b.

DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 243-275, 1984.

DE POOTER, H. L. et al. Acetic and propionic acids, inducers of ripening in pre-climateric golden delicious apples. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 23-26, 1984.

DERCHEL, J. et al. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St Paul, v. 89, n. 3, p. 197-203, 1999.

D'HALLEWIN, G. et al. Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 124, n. 6, p. 702-707, 1999.

DIAS, M. S. C.; SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, A. F. Principais doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.76-84, 1998.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* na proteção de plantas de maracujá contra o vírus do endurecimento dos frutos (PWV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 76, 2002.

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 a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. 2003. 157 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DROBY, S. et al. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 418-424, 1993.

DU, J.; GEMMA, H.; IWAHORIM, S. Effects of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit. **Journal of Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 66, n. 1, p. 15-22, 1997.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 235-264, 1986.

EIKEMO, H.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. M. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, n. 4, p. 345-350, 2003.

EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1618-1620, 1991a.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, Trumbull, v. 15, n. 5, p. 359-368, 1991b.

EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 4, p. 398-402, 1992a.

EL GHAOUTH, A. et al. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 1016-1018, 1992b.

EL GHAOUTH, A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 417-432, 1994.

EL GHAOUTH, A. et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 183-194, 1997.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; CALLAHAN, A. M. Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. **Phytopathology**, St Paul, v. 93, n. 3, p. 349-355, 2003a.

EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, St Paul, v. 93, n. 3, p. 344-348, 2003b.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. Host-parasite relationships. In.: WEICHMANN, J. (Ed.). **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 339-349.

ETHUGALA, C. V.; KARUNARATNE, A. M. Disease incidence, physicochemical changes and taste of bananas treated with acetic acid or vinegar. **Fruits**, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 11-18, 2002.

FAZIO, T.; WARNER, R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, n. 4, p. 433-454, 1990.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Sulfites: an important food safety issue. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>>. Acesso em: 19 nov. 2003.

FELICIO, J. D.; SANTOS, R. S.; GONÇALEZ, E. Chemical constituents from *Vitis vinifera* (Vitaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 47-50, 2001.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para a conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, São Paulo, v. 33, p. 9-13, 1967.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Atividade do extrato de *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e indução de fitoalexinas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 310, 2001. Suplemento.

FIORI, A. C. G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Indução de fitoalexinas e atividade antifúngica de *Lentinula edodes*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 1, p. 92, 2002.

FRANCO, D. A. S. **Controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros com produtos alternativos**. 1999. 103 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

FRÉMONT, L. Minireview: biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, Oxford, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

GALLOTTI, G. J. M.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças fúngicas da videira e seu controle no estado de Santa Catarina. **Boletim Técnico da Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária**, Florianópolis, n. 51, p. 1-46, 1990.

GOETZ, G. et al. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 759-767, 1999.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. rev. e ampl. Piracicaba: Nobel. 1990. 467 p.

GONZÁLEZ, A. C. et al. Influencia de la *Botrytis cinerea* en algunos componentes del mosto. **Viticultura: enologia professional**, Barcelona, n. 26, p. 44-50, mayo/jun 1993.

GONZALEZ, U. A. et al. Improving postharvest resistance in fruits by external application of trans-resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 1, p. 82-89, 2003.

GORGATTI NETTO, A. et al. **Uva para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita**. Brasília: Serviço de Produção da Informação/EMBRAPA, 1993. 40 p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 2).

GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, London, v. 10, n. 13, p. 751-757, 2000.

GUBLER, W. D. Control of Botrytis bunch rot of grape with canopy management. **Plant Disease**, St Paul, v. 71, n. 7, p. 599-601, 1987.

GUZZO, S. D. Proteínas Relacionadas à Patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 283-332, 2003.

HADWIGER, L. A.; SCHWOCHAU, M. E. Ultraviolet light-induced formation of pisatin and phenylalanine ammonia lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, n. 4, p. 588-590, 1971.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 2, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, n. 1, p. 61-71, 1982.

HANKE, W. T. **Preserva uvas fresca**: comentarios sobre condición de llegada de uva de mesa temporada 1996-1997. Santiago: Quimetal Industrial, 1997. 16p.

HARVEY, J. M. et al. Sulfur dioxide fumigation of table grapes: relative sorption of SO₂ by fruit and packages, SO₂ residues, decay and bleaching. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 2, p. 132-135, 1988.

HAWKSWORTH, D. L. et al. **Dictionary of the fungi**. Wallingford: CAB international, 1995. 616 p.

HEDBERG, P. R. Table grape storage. **Food Technology in Australia**, Sydney, v. 31, n. 2, p. 80-81, feb. 1979.

HIRANO, S.; NAGAO, N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 11, p. 3065-3066, 1989.

HOLZ, G. et al. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, n. 4, p. 351-358, 2003.

HURTADO, C. S.; MARTÍNEZ, T. M. Influencia de fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*. **Viticultura**: enología profesional, Barcelona, n. 45, p. 27-31, jul/sept. 1996.

ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 206-210, 2001.

JALIL, R. C.; NORENO, S. A.; APABLAZA, H. G. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y de su antagonista *Trichoderma harzianum*. **Ciência e Investigación Agrária**, Santiago, v. 24, n. 2/3, p. 125-132, 1997.

JARVIS, W. R. Latent infections in the pre and postharvest environment. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 749-751, 1994.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3,5,4'-trohydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42. n. 1, p. 41-46, 1991.

JIANG, Y.; LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 139-143, 2001.

KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2. ed. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, 1992. 296 p.

KANELIS, A. K.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Grape. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. L.; TUCKER, G. A. (Ed.). **Biochemistry of fruit ripening**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 189-234.

KELLER, M.; VIRET, O.; COLE, M. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. **Phytopathology**, St Paul, v. 93, n. 3, p. 316-322, 2003.

KENDRA, D. F.; CHRISTIAN, D.; HADWIGER, L. A. Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ β -1,3-glucanase digestion of sporelings and from fungal wall chitin actively inhibit frungal growth and enhance disease resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 35, n. 3, p. 215-230, 1989.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMIGH, D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, Germany, v. 160, n. 8, p. 859-863, 2003.

KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da videira. In: GALLI, F. (Coord.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1985. v. 2, p. 574-587. Doenças das plantas cultivadas.

KOCK, P. J.; HOLZ, G. Colonization of table grapes by *Botrytis cinerea* in the western cape province. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 23, n. 1, p. 73-80, 1991.

KOOMEN, I.; JEFFRIES, P. Effects of antagonist microorganisms on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant Pathology**, Palo Alto, v. 42, p. 230-37, 1993.

KUHN, G. B.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Uva. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 123, p. 33-40, mar. 1985.

LANGCAKE, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 18, n. 2, p. 213-226, 1981.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 9, n. 1, p. 77-86, 1976.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1193-1196, 1977.

- LÁSZLÓ, J. C. et al. Effect of temperature on the emission of sulphur dioxide from gas generators for grapes. **Deciduous Fruit Grower**, Cape Town, v. 31, n. 3, p. 112-119, 1981.
- LATORRE, G. B. Problemas fitopatológicos de los parronales de uva de mesa y su control. In: **PRODUCCION y manejo de uva de mesa**. Santiago: Fundacion Chile. 1984. Tomo 1, p. 207-219.
- LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, n. 6, p. 361-377, 1996.
- LEÃO, P. C. S. Principais variedades. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Ed.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 45-64.
- LEROUX, P. et al. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fucheliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. **Crop Protection**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 687-697, 1999.
- LICHTER, A. et al. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 301-308, 2002.
- LIU, J. et al. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 10, p. 868-872, 1993.
- LIU, W. T.; CHU, C. L. Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. **HortScience**, Alexandria, v. 37, n. 1, p. 151-156, 2002.
- LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 1, p. 21-39, 1996.

LU, J. Y. et al. Gamma, electron beam and ultraviolet radiation on control of storage rots and quality of walla walla onions. **Journal of Food Processing & Preservation**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 53-62, 1987.

LU, J. Y. et al. The effect of ultraviolet irradiation on shelf-life and ripening of peaches and apples. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 14, n. 4, p. 299-305, 1991.

LU, J. Y. et al. Low dose UV and gamma radiation on storage rot and physicochemical changes in peaches. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 16, n. 4, p. 301-309, 1993.

LYDAKIS, D.; AKED, J. Vapor heat treatment of Sultanina table grapes. I: Control of *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 109-116, 2003a.

LYDAKIS, D.; AKED, J. Vapor heat treatment of Sultanina table grapes. II: Effects on postharvest quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 117-126, 2003b.

MAGEE, J. B.; SMITH, B. J. Resveratrol content of Muscadine berries is affected by disease control spray program. **HortScience**, Alexandria, v. 37, n. 2, p. 358-361, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Anexo II: Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação da uva fina de mesa. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 19 nov. 2003.

MAROIS, J. J. et al. The influence of berry contact within grape clusters on the development of *Botrytis cinerea* and epicuticular wax. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, n. 4, p. 293-296, 1986.

MAROIS, J. J. et al. Effects of spray adjuvants on development of *Botrytis cinerea* on *Vitis vinifera* berries. **Phytopathology**, St Paul, v. 77, n. 8, p. 1148-1152, 1987.

MAROIS, J. J.; LUVISI, D. A. Diseases of stored grapes. In: CHAIRMAN, D.L.F. et al. **Grape pest management**. Oakland: Division of Agricultural and Natural Resources, 1992. p. 113-114.

MAROIS, J. J.; BLEDSOE, A. M.; BETTIGA, L. J. Bunch rots. In: CHAIRMAN, D.L.F. et al. **Grape pest management**. Oakland: Division of Agricultural and Natural Resources, 1992. p. 63-69.

MARQUENIE, D. et al. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 27-35, 2002.

MARQUENIE, D. et al. Pulsed white light in combination with UV-C and heat to reduce storage rot of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 455-461, 2003.

McCLELLAN, W. D.; HEWITT, W. B. Early *Botrytis* rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. **Phytopathology**, St Paul, v. 63, n. 9, p. 1151-1157, 1973.

MELLO, L. M. R. **Produção e comercialização de uvas, vinhos e derivados: panorama 2001**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/produva.html>>. Acesso em: 28 jul. 2003.

MERCIER, J. et al. Shortwave ultraviolet irradiation for control of decay caused by *Botrytis cinerea* in Bell pepper: induced resistance and germicidal effects. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 126, n. 1, p. 128-133, 2001.

- MÉTRAUX, J. P.; STREIT, L.; STAUB, T. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, n. 1, p. 1-9, 1988.
- MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.
- MORALES, A. Control de *Botrytis cinerea* en post-cosecha en Chile y condición de llegada de la uva a los diferentes mercados. In: **PRODUCCION y manejo de uva de mesa**. Santiago: Fundacion Chile. 1984. Tomo 2, p. 235-250.
- MOYANO, C.; MELGAREJO, P. Survival of *Botrytis cinerea* in soil in South-Eastern Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 10, p. 536-540, 2002.
- MOYLS, A. L.; SHOLBERG, P. L.; GAUNCE, A. P. Modified-atmosphere packaging of grapes and strawberries fumigated with acetic acid. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 414-416, 1996.
- NARUSAKA, Y. et al. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 40, n. 4, p. 388-395, 1999.
- NELSON, K. E. Factors influencing the infection of table grapes by *Botrytis cinerea* (Pers.). **Phytopathology**, St Paul, v. 41, n. 4, p. 319-326, 1951.
- NELSON, K. E. The effect of *Botrytis* infection on the tissue of Tokay grapes. **Phytopathology**, St Paul, v. 46, n. 4, p. 223-229, 1956.
- NELSON, K. E.; AHMEDULLAH, M. Packing and decay-control systems for storage and transit of table grapes for export. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 27, n. 2, p. 74-79, 1976.

NELSON, K. Índices de madurez de uva de mesa para establecer la cosecha, aplicación de normas de calidad y metodos de prediccion de pudriciones. In: **PRODUCCION y manejo de uva de mesa**. Santiago: Fundacion Chile. 1984. Tomo 2, p. 251-278a.

NELSON, K. Sistemas de manejo de postcosecha para uva de mesa en California y Chile: envases, embalaje, palletización, tratamiento con bromuro de metilo, aplicación de anhídrido sulfuroso y enfriado. In: **PRODUCCION y manejo de uva de mesa**. Santiago: Fundacion Chile. 1984. Tomo 2, p. 287-317b.

NELSON, K. Almacenamiento de uva de mesa: requerimientos ambientales, programa de tratamiento de anhídrido sulfuroso y desórdenes en el almacenamiento. In: **PRODUCCION y manejo de uva de mesa**. Santiago: Fundacion Chile. 1984. Tomo 2, p. 318-343c.

NICHOLSON, R. L.; WOOD, K. V. Mini-review: phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, n. 2, p. 63-69, 2001.

NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; LIMA, G. Use of UV-C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 171-181, 1998.

OSBOURN, A. E. Review. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 26, n. 3, p. 163-168, 1999.

PACUMBABA, R. P.; BEYL, C. A.; PACUMBABA JÚNIOR, R. O. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean *in vitro*. **Plant Disease**, St Paul, v. 83, n. 1, p. 20-23, 1999.

PALOMINO, O. et al. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid cromatography. **Journal of Cromatography A**, Amsterdam, v. 870, n. 1-2, p. 449-451, 2000.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI? In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. Perspectivas para o Século XXI. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 8-10.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 22, p. 417-453.

PASCHOLATI, S. F. et al. Efeito *in vitro* do ativador de defesa vegetal “Bion” no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 266-67, 1998. Suplemento.

PAUL, B. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 65-70, 1998.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape diseases**. St. Paul: APS Press, 1990. 93 p.

PEN, L. T.; JIANG, Y. M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 36, n. 3, p. 359-364, 2003.

PERERA, O. D. A. N.; KARUNARATNE, A. M. Response of bananas to postharvest acid treatments. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 76, n. 1, p. 70-76, 2001.

PÉREZ MARIN, J. L. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea* Pers.). In: **LOS PARASITOS de la vid: estrategia de protección razonada**. 4. ed. Madri: Mundi-Prensa, 1998. p. 183-188.

PESIS, E. Acetaldehyde vapors influence postharvest quality of table grapes. **HortScience**, Alexandria, v. 24, n. 2, p. 315-317, 1989.

PEZET, R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 167, n. 2, p. 203-208, 1998.

PEZET, R.; PONT, V. Activité antifongique dans les baies de *Vitis vinifera*: effets d'acides organiques et du ptérostilbène. **Viticulture, Arboriculture, Horticulture**, Nyon, v. 20, n. 5, p. 303-309, 1988.

PEZET, R.; PONT, V.; HOANG-VAN, K. Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, n. 6, p. 441-450, 1991.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo**. 2000. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

POMMER, C. V.; MAIA, M. L. Introdução. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 11-35.

PORAT, R. et al. Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. **Phytoparasitica**, Rehovot, v. 27, n. 3, p. 233-238, 1999.

PRASAD, K.; STADELBACHER, G. J. Control of postharvest decay of fresh raspberries by acetaldehyde vapor. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 57, n. 9, p. 795-797, 1973.

PRASAD, K.; STADELBACHER, G. J. Effect of acetaldehyde vapor on postharvest decay and market quality of fresh strawberries. **Phytopathology**, St Paul, v. 64, n. 7, p. 948-951, 1974.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 413-434, 1996.

PRUSKY, D.; KEEN, N. T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease**, St Paul, v. 77, n. 2, p. 114-19, 1993.

RAZUNGLES, A. et al. Grape carotenoids: changes during the maturation period and localization in mature berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 1, p.44-48, 1988.

REBORDINOS, L. et al. The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 383-387, 1996.

REDDY, M. V. B. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 39-51, 2000.

RESENDE, M. L. V. Aspectos moleculares envolvendo o fenômeno da indução de resistência. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS

CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. Perspectivas para o Século XXI. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 35-36.

REMATALES, J. et al. High-CO₂ controlled atmospheres reduce decay incidence in Thompson Seedless and Red Globe table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 177-182, 2003.

RIBEIRO, I. J. A. Doenças causadas por fungos e bactérias na cultura da videira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE UVAS DE MESA, 1. 2000, Ilha Solteira. Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização. **Anais...** Ilha Solteira: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 237-263.

RIJ, R. E.; FORNEY, C. F. Phytotoxicity of vapor phase hydrogen peroxide to Thompson Seedless grapes and *Botrytis cinerea* spores. **Crop Protection**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 131-135, 1995.

RODOV, V. et al. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 5, p. 788-792, 1992.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 67-77, 1999.

ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Food Microbiology and Safety**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862-1867, 2002.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan reducing storage decay of sweet cherries. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p. 73-80, 2003.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 1999. 45 p. (Cadernos didáticos, 56).

ROMEIRO, R. S. Induced resistance in plants to pathogens in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 254-256, 2001. Suplemento.

ROSENQUIST, J. K.; MORRISON, J. C. Some factors affecting cuticle and wax accumulation on grape berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 40. n. 4, p. 241-244, 1989.

ROSSLENBROICH, H. J.; STUEBLER, D. *Botrytis cinerea*: history of chemical control and novel fungicides for its management. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 8-10, p. 557-561, 2000.

RUFFNER, H. P.; HAWKER, J. S.; HALE, C. R. Temperature and enzymic control of malate metabolism in berries of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 1877-1880, 1976.

RUFFNER, H. P. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review: part A. **Vitis**, Siebeldingen, v. 21, n. 3, p. 247-259, 1982.

SARIG, P. et al. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.48, n. 6, p.403-415, 1996.

SARIG, P. et al. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 5, p. 337-347, 1997.

SASAKI, S. H. **Protoplastização de *Lentinula edodes* e seu antagonismo sobre o vírus VSA e sobre fungos filamentosos.** 1997, 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração Fitopatologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.

SAVAGE, S. D.; SALL, M. A. Botrytis bunch rot of grapes: the influence of selected cultural practices on infection under California conditions. **Plant Disease**, St Paul, v. 67, n. 7, p. 771-774, 1983.

SAVAGE, S. D.; SALL, M. A. Botrytis bunch rot of grapes: influence of trellis type and canopy microclima. **Phytopathology**, St Paul, v. 74, n. 1, p. 65-70, 1984.

SBAGHI, M. et al. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 139-144, 1996.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SHOLBERG, P. L.; GAUNCE, A. P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 6, p. 1271-1275, 1995.

SHOLBERG, P. L.; GAUNCE, A. P. Fumigation of stonefruit with acetic acid to control postharvest decay. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 681-686, 1996.

SHOLBERG, P. L.; REYNOLDS, A. G.; GAUNCE, A. P. Fumigation of table grapes with acetic acid to prevent postharvest decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1425-1428, 1996.

SHOLBERG, P. L. Fumigation of fruit with short-chain organic acids to reduce the potential of postharvest decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 6, p. 689-693, 1998.

SHOLBERG, P. L. et al. The use of vinegar vapor to reduce postharvest decay of harvested fruit. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 5, p. 898-903, 2000.

SHOLBERG, P. L.; CLIFF, M.; MOYLS, A. L. Fumigation with acetic acid vapor to control decay of stored apples. **Fruits**, Cambridge, v. 56, n. 5, p. 355-366, 2001.

SMILANICK, J. L.; HENSON, D. J. Minimum gaseous sulphur dioxide concentrations and exposure periods to control *Botrytis cinerea*. **Crop Protection**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 535-540, 1992.

SNOWDON, A. L. **A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables**: general introduction and fruits. London: Wolfe Scientific, 1990. v. 1, 302 p.

SOUZA, M. G.; FERREIRA, F. A. Temperatura e tempo de água livre favoráveis à infectividade de *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Meiden, via inoculações. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 193-196, 1999.

SPOTTZ, R. A.; HOLZ, G. Adhesion and removal of conidia of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* from grape and plum fruit surfaces. **Plant Disease**, St Paul, v. 80, n. 6, p. 688-691, 1996.

SPOTTZ, R. A.; CERVANTES, L. A. Disease incidence: inoculum dose relationships for *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* and decay of pear fruit using dry, airborne conidia. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, n. 7, p. 755-759, 2001.

STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos do fenômeno da indução de resistência. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. Perspectivas para o Século XXI. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 37-38.

STEVENS, C. et al. Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 129-134, 1996.

STEVENS, C. et al. The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing brown rot disease and yeast microflora of peaches. **Crop Protection**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 75-84, 1998.

STEVENS, C. et al. Induced resistance of sweetpotato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. **Crop Protection**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 463-470, 1999.

TAKEDA, F.; SAUNDERS, M. S.; SAUNDERS, J. A. Physical and chemical changes in Muscadine grapes during postharvest storage. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 34, n. 3, p.180-185, 1983.

TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Ed.) **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. p. 293-346.

TERRA, M. M. **Tecnologia para produção de uva Itália na região noroeste do Estado de São Paulo**, 2. ed. Campinas: CATI, 1998. 81 p. (Documento Técnico, 97)

TERRY, A. L.; JOYCE, D. C. Suppression of grey mould on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 11, p. 989-992, 2000.

THOMAS, C. S.; MAROIS, J. J.; ENGLISH, J.T. The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape. **Phytopathology**, St Paul, v. 78, n. 3, p. 260-265, 1988.

TONUCCI, N. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de filtrados de basidiocarpos de *Lentinula edodes* na expressão de lesões causadas pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV) em fumo e na

multiplicação *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S370, 2003. Suplemento.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Press, 1969. 239 p.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, C. Cogumelos comestíveis: utilização e fontes genéticas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 173-196, 1998.

VAIL, M. E.; MAROIS, J. J. Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, n. 2, p. 188-191, 1991.

WASSER, S. P.; WEIS, A. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

WILLS, R. et al. Patología. In:____. **Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 129-141.

WILSON, C. L. et al. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 172-177, 1991.

WINKLER, A. J. Enfermedades y trastornos fisiológicos de las vides y uvas. In:____. **Viticultura**. Califórnia: Continental, 1970. p. 469-541.

WURMS, K. V. et al. The potential for resistance to *Botrytis cinerea* by kiwifruit. **Crop Protection**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 427-435, 1999.

ZAHAVI, T. et al. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 115-124, 2000.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 195-202, 1997.

ZOFFOLI, J. P. et al. Modified atmosphere packaging using chlorine gas generators to prevent *Botrytis cinerea* on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 135-142, 1999.

APÊNDICES



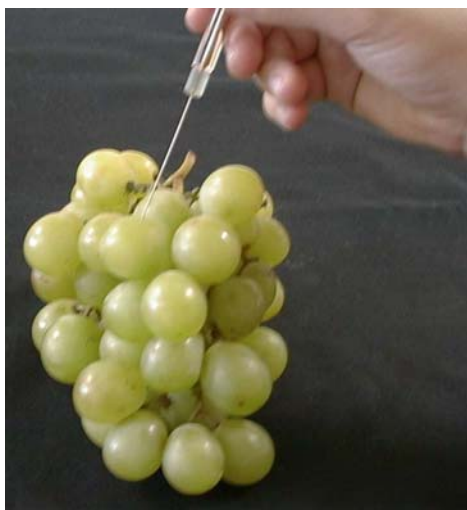
Apêndice 1. Mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) em uva 'Itália'.



Apêndice 2. Basidiocarpos de *Lentinula edodes* produzidos em toras de eucalipto. Escala 1:10
(Extraído de DI PIERO, 2003).



Apêndice 3. Basidiocarpos de *Agaricus blazei* produzidos em substrato. Escala 1:2 (Extraído de DI PIERO, 2003).



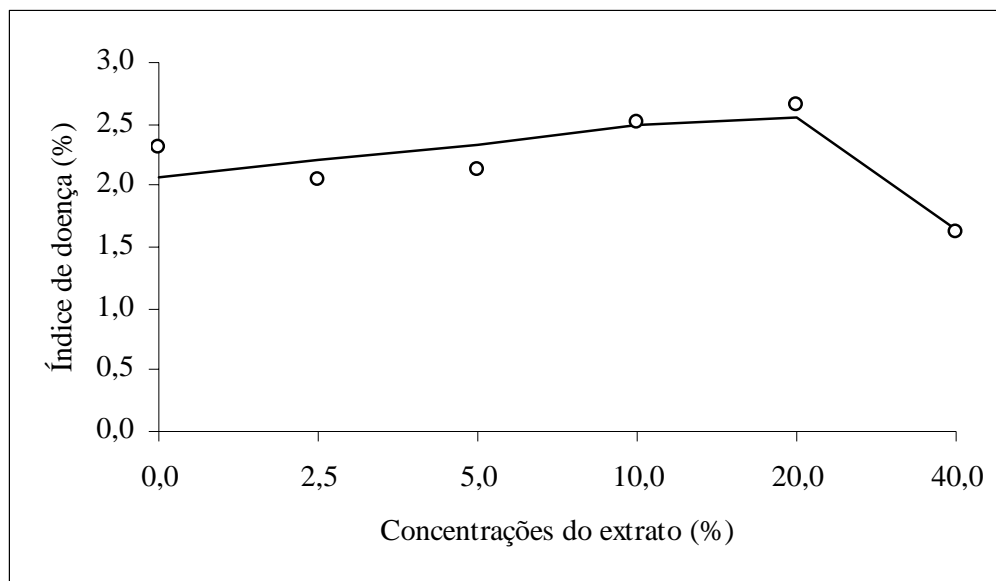
Apêndice 4. Inoculação das bagas de uva 'Itália' por meio de ferimento superficial seguido de aspersão com suspensão de conídios do patógeno *Botrytis cinerea*.



Apêndice 5. Cachos de uva 'Itália' acondicionados em tambores de 200 L para vaporização com ácido acético.



Apêndice 6. Cachos de uva 'Itália' no interior do equipamento de irradiação UV-C.



Apêndice 7. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea*, em função das concentrações do extrato de *Lentinula edodes*, após dois dias de armazenamento sob condições ambiente. Média de dez repetições.

Apêndice 8. Análises físicas e físico-químicas de cachos de uva 'Itália' inoculados com *Botrytis cinerea* e tratados, por aspersão, após 4 h de incubação, com os extratos de *Agaricus blazei* (A) e *Lentinula edodes* (B), após seis dias de armazenamento a $25\pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Análises físico-químicas								
Tratamentos					Cor da baga ^z			
	AT (g.100g ⁻¹)	SS (°Brix)	pH	Aparência da ráquis ^y	L	a	b	
Colheita	0,70 ^x	13,2	3,31	1,0	43,10	-5,86	10,80	
A	0,0 %	0,63 a	13,84 a	3,38 a	4,2 a	42,67 a	-5,69 a	10,41 ab
	2,5 %	0,65 a	13,56 a	3,37 a	4,4 a	42,90 a	-5,80 a	10,92 a
	5,0 %	0,69 a	12,80 a	3,37 a	4,4 a	41,80 ab	-5,84 a	10,40 ab
	10,0 %	0,61 a	13,44 a	3,45 a	4,8 a	40,09 b	-5,34 a	9,84 b
	20,0 %	0,68 a	13,12 a	3,36 a	4,4 a	41,52 ab	-5,46 a	10,28 ab
	40,0 %	0,67 a	13,12 a	3,37 a	4,4 a	42,75 a	-5,31 a	10,26 ab
	C.V. (%)	12,81	7,80	2,17	13,34	2,78	5,58	5,27
B	0,00 %	0,63 a	13,84 a	3,38 a	4,2 a	42,67 a	-5,69 a	10,41 a
	2,50 %	0,64 a	14,20 a	3,42 a	4,4 a	42,17 a	-5,81 a	10,62 a
	5,00 %	0,64 a	13,16 a	3,35 a	4,6 a	41,70 a	-5,92 a	10,79 a
	10,00 %	0,68 a	13,72 a	3,33 a	4,4 a	42,09 a	-5,72 a	10,98 a
	20,00 %	0,66 a	13,72 a	3,35 a	4,4 a	41,66 a	-5,50 a	10,29 a
	40,00 %	0,68 a	13,12 a	3,33 a	4,8 a	41,58 a	-5,55 a	10,52 a
	C.V. (%)	8,41	5,02	1,65	13,24	2,30	4,12	4,51

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

Apêndice 9. Análises físicas e físico-químicas em cachos de uva 'Itália' antes do tratamento com o extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %) para posterior inoculação.

<i>A. blazei</i> (5%)	AT (g.100g ⁻¹)	SS (°Brix)	pH	Cor da baga ^z				
				L	a	b	Croma	HUE
24 h	0,44 ^y a	16,16 a	3,50 a	42,11 a	-5,15 a	12,60 b	13,62 b	-67,77 b
48 h	0,43 a	16,78 a	3,53 a	41,32 a	-5,24 a	13,25 b	14,25 b	-68,42 b
72 h	0,45 a	15,96 a	3,50 a	41,84 a	-8,64 b	16,23 a	18,39 a	-61,97 a
96 h	0,47 a	16,36 a	3,51 a	42,08 a	-8,20 b	15,67 a	17,69 a	-62,40 a
C.V. (%)	8,94	5,28	1,49	1,98	6,22	3,38	3,40	1,94

^yMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo). Croma = $\sqrt{a^2 + b^2}$ e HUE = $\tan^{-1}(b/a) * 180/\pi$.

Apêndice 10a. Cor das bagas de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratadas com extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
L ^y	Com <i>Agaricus</i>	44,84 ^x	52,72	44,89	43,83	46,57 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	44,81	44,45	44,86	44,38	44,63 a	
	Média	44,82 A	48,58 A	44,87 A	44,11 A		
ns							
C.V. (%)		13,63					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
a ^y	Com <i>Agaricus</i>	-5,12	-5,03	-5,17	-5,24	-5,14 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	-5,28	-4,81	-5,32	-5,19	-5,15 a	
	Média	-5,20 A	-4,92 A	-5,25 A	-5,22 A		
ns							
C.V. (%)		7,69					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
b ^y	Com <i>Agaricus</i>	11,02	11,26	11,31	11,38	11,24 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	11,54	11,38	11,19	11,40	11,38 a	
	Média	11,28 A	11,32 A	11,25 A	11,39 A		
ns							
C.V. (%)		5,36					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo.

Apêndice 10b. Aparência da ráquis, Acidez Titulável (AT), Sólidos Solúveis (SS) e pH de cachos de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratados com extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

		Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
Aparência da ráquis ^y	Com <i>Agaricus</i>	2,60 ^x	2,80	3,20	2,80	2,85 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	3,00	2,80	2,40	2,40	2,65 a	
	Média	2,80 A	2,80 A	2,80 A	2,60 A		
		ns					
C.V. (%)		24,73					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
AT (g.100g ⁻¹)	Com <i>Agaricus</i>	0,46	0,51	0,51	0,45	0,48 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	0,50	0,50	0,49	0,48	0,49 a	
	Média	0,48 A	0,50 A	0,50 A	0,46 A		
		*					
C.V. (%)		6,96					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
SS (°Brix)	Com <i>Agaricus</i>	16,32	16,24	16,28	16,76	16,40 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	16,68	16,40	16,76	16,80	16,66 a	
	Média	16,50 A	16,32 A	16,52 A	16,78 A		
		ns					
C.V. (%)		5,79					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
pH	Com <i>Agaricus</i>	3,48	3,50	3,54	3,56	3,52 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	3,47	3,49	3,54	3,53	3,51 a	
	Média	3,48 C	3,49 BC	3,54 AB	3,55 A		
		**					
C.V. (%)		1,15					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físico-químicos da uva, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 11a. Cor das bagas de uva 'Itália', tratadas por aspersão, com extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculadas com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a $25\pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
L ^y	Com <i>Agaricus</i>	42,97 ^x	41,58	40,54	42,98	42,02 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	43,11	42,37	41,87	41,75	42,27 a	
	Média	43,04 A	41,97 AB	41,20 B	42,37 AB		
**							
C.V. (%)		2,71					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
a ^y	Com <i>Agaricus</i>	-5,16 Ba	-4,48 Aa	-4,80 ABa	-5,34 Ba	-4,95 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	-5,13 Aa	-5,36 Ab	-5,00 Aa	-5,10 Aa	-5,15 a	
	Média	ns	**	ns	ns		
ns							
C.V. (%)		6,93					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
b ^y	Com <i>Agaricus</i>	11,36	11,55	11,41	11,13	11,36 a	*
	Sem <i>Agaricus</i>	10,94	10,98	11,16	10,85	10,98 b	
	Média	11,15 A	11,26 A	11,28 A	10,99 A		
ns							
C.V. (%)		5,14					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

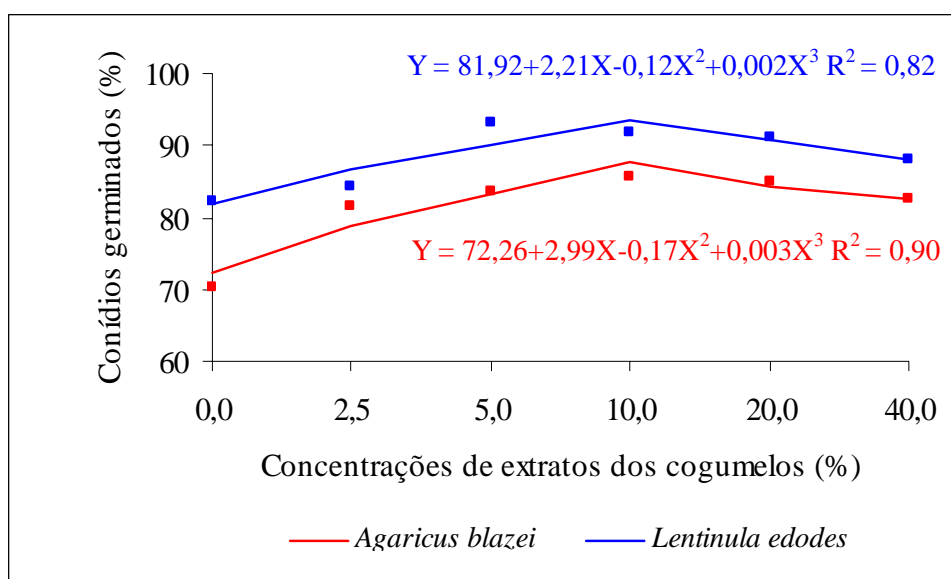
^z Significância do teste F da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo; *, ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 11b. Acidez titulável (AT), Sólidos Solúveis (SS) e pH de cachos de uva 'Itália', tratados por aspersão com extrato de *Agaricus blazei* (5,0 %) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculados com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a $25\pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

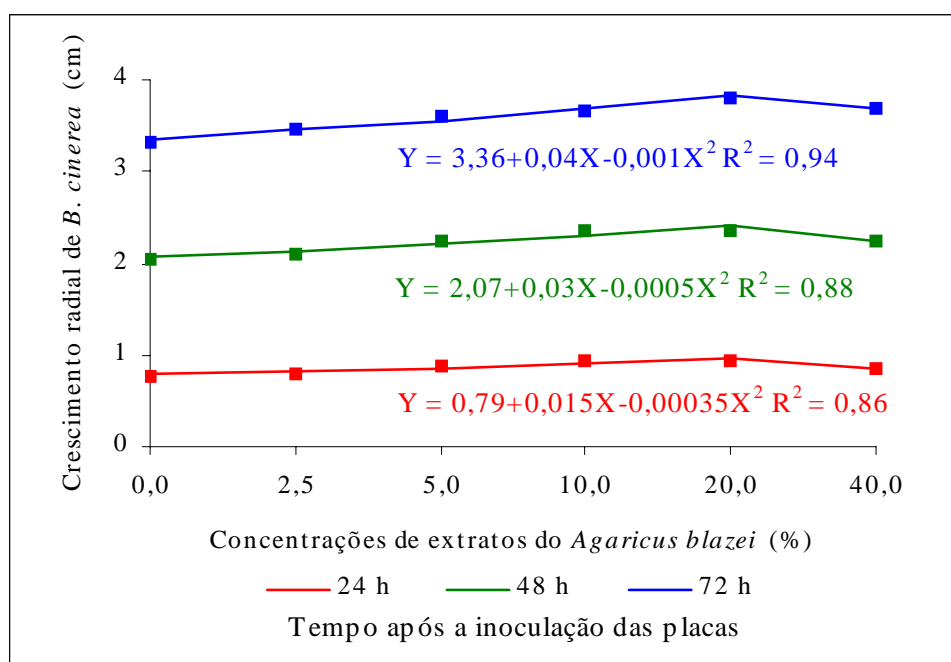
Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
AT (g.100g ⁻¹)	Com <i>Agaricus</i>	0,49 ^y	0,47	0,48	0,47	0,48 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	0,50	0,50	0,50	0,47	0,49 a	
	Média	0,49 A	0,48 A	0,49 A	0,47 A		
ns							
C.V. (%)				7,84			
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
SS (°Brix)	Com <i>Agaricus</i>	16,68	16,24	16,92	17,04	16,72 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	16,68	16,60	16,48	16,76	16,63 a	
	Média	16,68 A	16,42 A	16,70 A	16,90 A		
ns							
C.V. (%)				5,86			
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
pH	Com <i>Agaricus</i>	3,47	3,49	3,51	3,49	3,49 a	ns
	Sem <i>Agaricus</i>	3,50	3,48	3,48	3,44	3,48 a	
	Média	3,49 A	3,48 A	3,50 A	3,46 A		
ns							
C.V. (%)				1,15			

^y Média de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

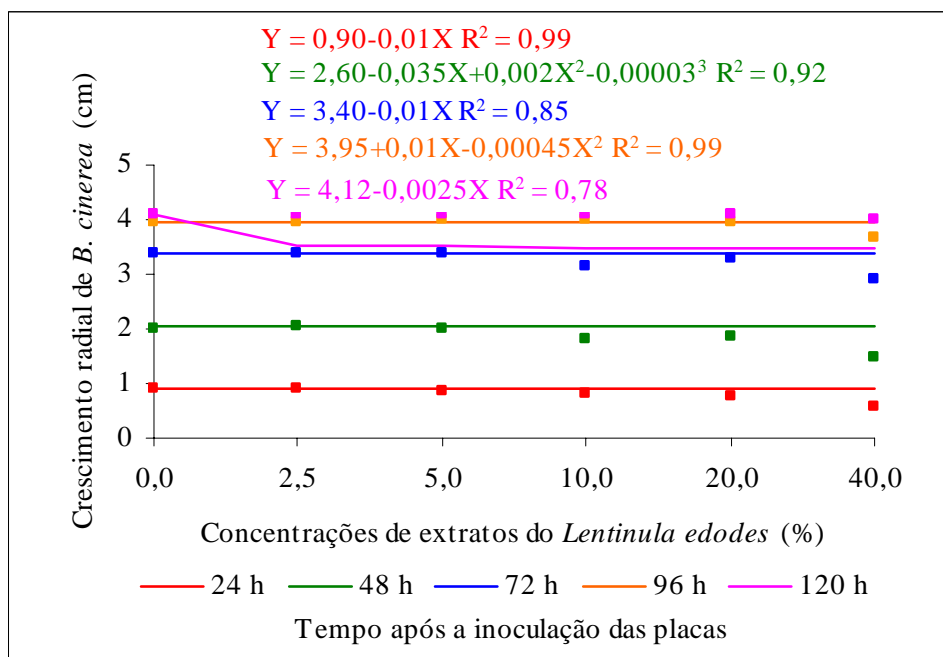
^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros químicos da uva, n.s. = não significativo.



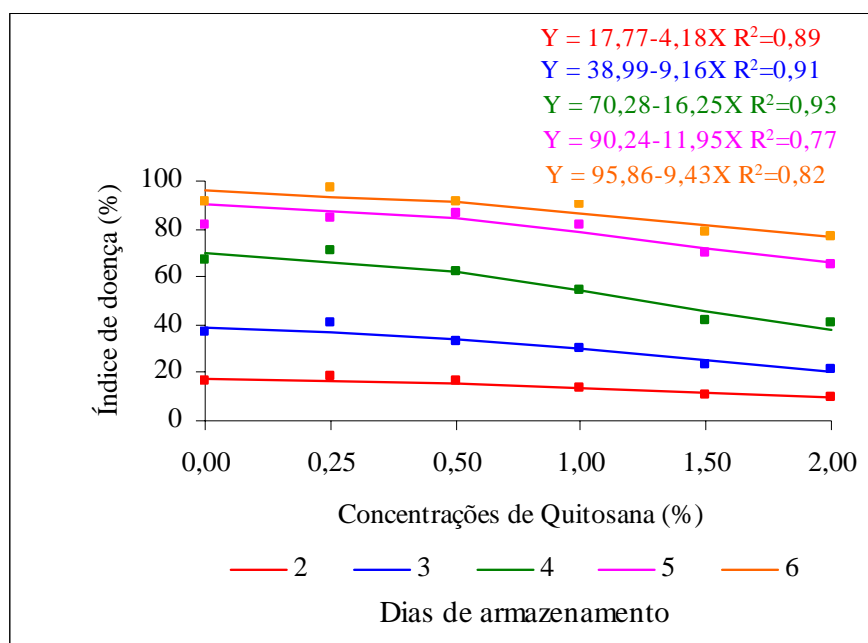
Apêndice 12. Efeito de diferentes concentrações de extratos de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*. Média de dez repetições.



Apêndice 13. Efeito de diferentes concentrações de extratos de *Agaricus blazei* sobre o crescimento radial de *Botrytis cinerea*. Média de sete repetições.



Apêndice 14. Efeito de diferentes concentrações de extratos de *Lentinula edodes* sobre o crescimento radial de *Botrytis cinerea*. Média de seis repetições.



Apêndice 15. Índice de doença (%) em cachos de uva 'Itália', inoculados com *Botrytis cinerea*, em função das concentrações de quitosana. Média de dez repetições.

Apêndice 16. Análises físicas e físico-químicas de cachos de uva 'Itália' inoculados com *Botrytis cinerea* e tratados, por aspersão, após 4 h, com diferentes concentrações de quitosana, após seis dias de armazenamento a $25\pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

Análises físico-químicas							
Trata/os (%)	Cor da boga ^z						
	AT (g.100g ⁻¹)	SS (°Brix)	pH	Aparência da ráquis ^y	L	a	b
INICIAL	0,37 ^x	15,36	3,58	1,0	44,53	-5,58	10,49
0,00	0,34 a	16,52 a	3,73 a	4,4 a	42,65 b	-4,81 a	11,41 a
0,25	0,36 a	15,32 a	3,59 a	4,2 a	45,41 a	-4,72 a	10,07 ab
0,50	0,35 a	16,12 a	3,64 a	4,6 a	42,91 b	-4,66 a	9,83 b
1,00	0,34 a	15,44 a	3,57 a	3,6 a	41,63 b	-4,59 a	10,10 ab
1,50	0,35 a	16,32 a	3,69 a	3,8 a	42,84 b	-4,64 a	10,19 ab
2,00	0,36 a	16,64 a	3,64 a	4,6 a	43,92 ab	-4,43 a	9,48 b
C.V. (%)	5,58	7,72	3,14	19,68	2,89	8,20	7,11

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra mnúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

^y1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

Apêndice 17. Análises físicas e físico-químicas em cachos de uva 'Itália' antes do tratamento com solução de quitosana (1,5 %) para posterior inoculação.

		Análises físicas e físico-químicas									
Quitosana (1,5%)							Cor da baga ^z				
	AT (g.100g ⁻¹)	SS (°Brix)	pH	Aparência da Ráquis ^y	L	a	b	Croma	HUE		
24 h	0,80 a ^x	14,24 a	3,16 ab	2,00 a	43,17 a	-6,54 b	14,87 a	16,25 a	-66,31 a		
48 h	0,93 a	14,18 a	3,11 b	2,00 a	43,73 a	-6,23 ab	13,82 a	15,17 a	-65,76 a		
72 h	0,73 a	15,14 a	3,25 a	1,40 a	42,87 a	-5,82 ab	13,92 a	15,10 a	-67,25 a		
96 h	0,84 a	14,44 a	3,15 ab	1,40 a	43,97 a	-5,47 a	12,59 b	13,73 b	-66,58 a		
C.V. (%)	15,32	8,82	1,78	42,62	1,95	9,46	4,58	4,73	2,67		

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁺=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo). Croma = $\sqrt{a^2 + b^2}$ e HUE = $\tan^{-1}(b/a) \cdot 180/\pi$.

Apêndice 18a. Cor das bagas de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratadas com solução de quitosana (1,5 %) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
L ^y	Com Quitosana	44,86 ^x	44,95	44,69	44,86	44,84 a	**
	Sem Quitosana	43,48	44,12	44,37	43,67	43,91 b	
	Média	44,17 A	44,53 A	44,53 A	44,27 A		
ns							
C.V. (%)		1,98					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
a ^y	Com Quitosana	-4,59 Aa	-5,83 Ba	-5,32 Ba	-5,50 Ba	**	-5,31 a ns
	Sem Quitosana	-5,43 Ab	-5,46 Aa	-5,59 Aa	-5,65 Aa	ns	-5,53 a
	Média	**	ns	ns	ns		
**							
C.V. (%)		7,70					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
b ^y	Com Quitosana	11,42	12,09	11,68	11,32	11,63 b	*
	Sem Quitosana	12,53	11,70	12,43	12,22	12,22 a	
	Média	11,98 A	11,90 A	12,05 A	11,77 A		
ns							
C.V. (%)		5,92					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

^z Significância do teste F da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo; *, ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 18b. Aparência da ráquis, Acidez Titulável (AT), Sólidos Solúveis (SS) e pH de cachos de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratados solução de quitosana (1,5 %) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

		Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z						
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
Aparência da ráquis ^y	Com Quitosana	4,00 ^x	4,00	4,60	3,80	4,10 a	ns	
	Sem Quitosana	3,80	4,20	4,60	3,00	3,90 a		
	Média	3,90 BC	4,10 AB	4,60 A	3,40 C			
		**						
		C.V. (%)					13,11	
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
AT (g.100g ⁻¹)	Com Quitosana	0,78	0,81	0,89	0,91	0,85 a	ns	
	Sem Quitosana	0,79	0,83	0,85	0,85	0,83 a		
	Média	0,78 A	0,82 A	0,87 A	0,88 A			
		ns						
		C.V. (%)					11,28	
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
SS (°Brix)	Com Quitosana	15,66	14,36	14,80	14,64	14,87 a	ns	
	Sem Quitosana	15,08	15,86	15,50	14,76	15,30 a		
	Média	15,37 A	15,11 A	15,15 A	14,70 A			
		ns						
		C.V. (%)					6,02	
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
pH	Com Quitosana	3,16	3,15	3,14	3,08	3,13 a	ns	
	Sem Quitosana	3,11	3,13	3,17	3,09	3,13 a		
	Média	3,13 AB	3,14 AB	3,16 A	3,09 B			
		ns						
		C.V. (%)					1,86	

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físico-químicos da uva, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 19a. Cor das bagas de uva 'Itália', tratadas por aspersão, com solução de quitosana (1,5 %) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculadas com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ / 80-90 % UR.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
	24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
L ^y	Com Quitosana	43,75 ^x	43,70	43,36	43,42	43,56 a	ns
	Sem Quitosana	43,67	43,56	43,40	43,42	43,51 a	
	Média	43,71 A	43,63 A	43,38 A	43,42 A		
ns							
C.V. (%)		2,16					
	24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
a ^y	Com Quitosana	-5,43	-4,94	-5,16	-5,24	-5,19 a	ns
	Sem Quitosana	-5,34	-5,37	-5,07	-5,11	-5,22 a	
	Média	-5,39 A	-5,16 A	-5,12 A	-5,18 A		
ns							
C.V. (%)		10,86					
	24 h	48 h	72 h	96 h	Média		
b ^y	Com Quitosana	11,24	11,48	11,89	11,42	11,51 b	**
	Sem Quitosana	12,23	12,43	12,06	11,95	12,17 a	
	Média	11,74 A	11,95 A	11,97 A	11,69 A		
ns							
C.V. (%)		5,66					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P\leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

^z Significância do teste F da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

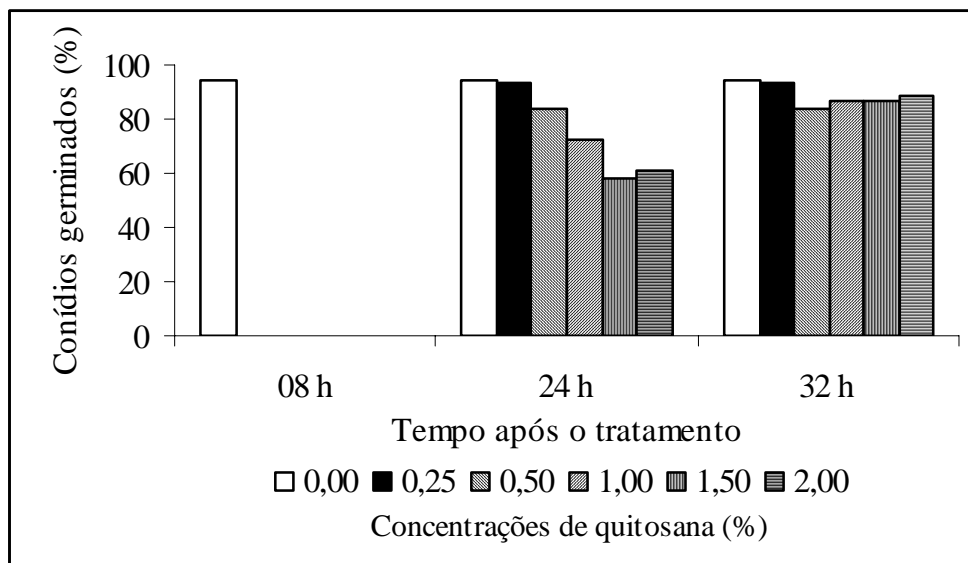
Apêndice 19b. Aparência da ráquis, Acidez titulável (AT), Sólidos Solúveis (°Brix) e pH de cachos de uva 'Itália', tratados por aspersão com solução de quitosana (1,5 %) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculados com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a 25±1°C / 80-90 % UR.

		Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
Aparência da ráquis ^y	Com Quitosana	4,80 ^x	4,80	5,00	5,00	4,90 a	ns
	Sem Quitosana	5,00	5,00	5,00	4,40	4,85 a	
	Média	4,90 A	4,90 A	5,00 A	4,70 A		
		ns					
C.V. (%)		10,76					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
AT (g.100g ⁻¹)	Com Quitosana	0,76	0,78	0,74	0,70	0,75 a	ns
	Sem Quitosana	0,76	0,78	0,66	0,77	0,74 a	
	Média	0,76 A	0,78 A	0,70 A	0,74 A		
		ns					
C.V. (%)		13,23					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
SS (°Brix)	Com Quitosana	14,46	15,28	16,04	14,88	15,17 a	ns
	Sem Quitosana	15,10	14,36	16,12	16,08	15,42 a	
	Média	14,78 A	14,82 A	16,08 A	15,48 A		
		*					
C.V. (%)		7,29					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
pH	Com Quitosana	3,18	3,17	3,21	3,20	3,19 a	ns
	Sem Quitosana	3,17	3,17	3,20	3,21	3,19 a	
	Média	3,17 A	3,17 A	3,20 A	3,21 A		
		ns					
C.V. (%)		2,25					

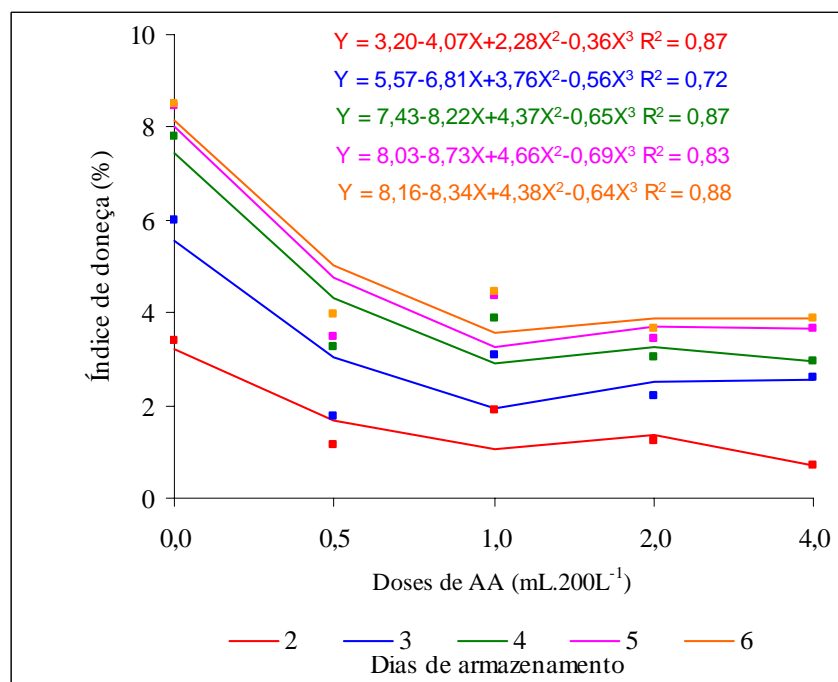
^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros químicos da uva, n.s. = não significativo.



Apêndice 20. Efeito de diferentes concentrações de quitosana sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*.



Apêndice 21. Índice de doença (%) causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de ácido acético (AA), 4 h após a inoculação com o patógeno. Média de dez repetições.

Apêndice 22. Análises físicas e físico-químicas em cachos de uva 'Itália' antes da vaporização com ácido acético (10,5 mg.L⁻¹) para posterior inoculação.

AA 10,5 mg.L ⁻¹	Cor da baga ^z						
	AT (g.100g ⁻¹)	SS (°Brix)	pH	Aparência da ráquis ^y	L	a	b
24 h	0,57 ^x a	15,70 a	3,83 a	1,6 a	44,10 a	-5,19 a	11,68 a
48 h	0,67 a	15,22 a	3,74 a	1,2 a	43,77 a	-5,48 a	11,38 a
72 h	0,54 a	16,56 a	3,87 a	1,2 a	44,42 a	-5,39 a	11,63 a
96 h	0,58 a	15,56 a	3,83 a	1,2 a	43,48 a	-5,45 a	11,11 a
C.V. (%)	17,86	6,39	3,53	36,49	2,45	4,98	7,64

^x Média de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, mnúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

Apêndice 23a. Cor das baga de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratadas com vapor de ácido acético (10,5 mg.L⁻¹) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
L ^y	Com AA	43,36 ^x	43,94	43,84	43,80	43,73 b	*
	Sem AA	44,22	44,19	44,93	44,90	44,56 a	
	Média	43,79 A	44,06 A	44,38 A	44,35 A		
ns							
C.V. (%)		2,46					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
a ^y	Com AA	-5,06	-5,14	-5,36	-5,48	-5,26 a	ns
	Sem AA	-5,43	-5,34	-5,30	-5,49	-5,39 a	
	Média	-5,25 A	-5,24 A	-5,33 A	-5,49 A		
ns							
C.V. (%)		6,06					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
b ^y	Com AA	10,74	10,82	10,85	11,62	11,01 a	ns
	Sem AA	10,64	10,81	11,01	11,99	11,12 a	
	Média	10,69 B	10,82 AB	10,93 AB	11,81 A		
*							
C.V. (%)		8,24					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo, *, ** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 23b. Aparência da ráquis, Acidez Titulável (AT), Sólidos Solúveis (°Brix) e pH de cachos de uva 'Itália', momento antes da inoculação com *Botrytis cinerea*, previamente tratados com vapor de ácido acético (10,5 mg.L⁻¹) há 24, 48, 72 ou 96 h antes da inoculação.

		Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
Aparência da ráquis ^y	Com AA	2,40 ^x	2,80	3,20	3,20	2,90 a	ns
	Sem AA	2,40	2,60	3,00	3,40	2,85 a	
	Média	2,40 C	2,70 BC	3,10 AB	3,30 A		
		**					
C.V. (%)		16,50					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
AT (g.100g ⁻¹)	Com AA	0,64	0,60	0,53	0,57	0,59 a	*
	Sem AA	0,57	0,50	0,55	0,50	0,53 b	
	Média	0,61 A	0,55 A	0,54 A	0,54 A		
		ns					
C.V. (%)		13,19					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
SS (°Brix)	Com AA	15,88	15,20	14,96	15,08	15,28 b	**
	Sem AA	15,68	16,36	16,00	16,32	16,09 a	
	Média	15,78 A	15,78 A	15,48 A	15,70 A		
		ns					
C.V. (%)		4,71					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
pH	Com AA	3,81	3,84	3,82	3,75	3,81 b	*
	Sem AA	3,95	3,88	3,92	3,84	3,90 a	
	Média	3,88 A	3,86 A	3,87 A	3,80 A		
		ns					
C.V. (%)		2,87					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físicos e físico-químicos da uva, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 24a. Cor das bagas de uva 'Itália', tratada por vaporização, com ácido acético (10,5 mg.L⁻¹) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculada com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a 25±1°C / 80-90 % UR.

Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^z							
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
L ^y	Com AA	42,44 ^x	43,26	42,82	43,29	42,96 a	ns
	Sem AA	42,95	43,53	42,65	43,30	43,11 a	
	Média	42,70 A	43,40 A	42,74 A	43,30 A		
ns							
C.V. (%)		2,14					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
a ^y	Com AA	-5,35	-5,51	-5,37	-5,19	5,35 a	ns
	Sem AA	-5,41	-5,34	-5,32	-5,53	5,40 a	
	Média	-5,38 A	-5,42 A	-5,34 A	-5,36 A		
ns							
C.V. (%)		4,43					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
b ^y	Com AA	11,40	10,92	10,67	10,38	10,84 a	ns
	Sem AA	11,04	11,30	11,09	11,55	11,25 a	
	Média	11,22 A	11,11 A	10,88 A	10,96 A		
ns							
C.V. (%)		5,79					

^xMédia de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

^y Em colorímetro Minolta, sistema L* a* b*, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), a* e b* cromaticidade (a⁻=verde a a⁺=vermelho e, b⁻=azul a b⁺=amarelo).

^z Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre a cor das bagas, n.s. = não significativo; *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

Apêndice 24b. Aparência da ráquis e degrana (%) de cachos de uva 'Itália', tratados por vaporização com ácido acético ($10,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e, após 24, 48, 72 e 96 h, inoculados com *Botrytis cinerea*, após quatro dias de armazenamento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 80-90 % UR.

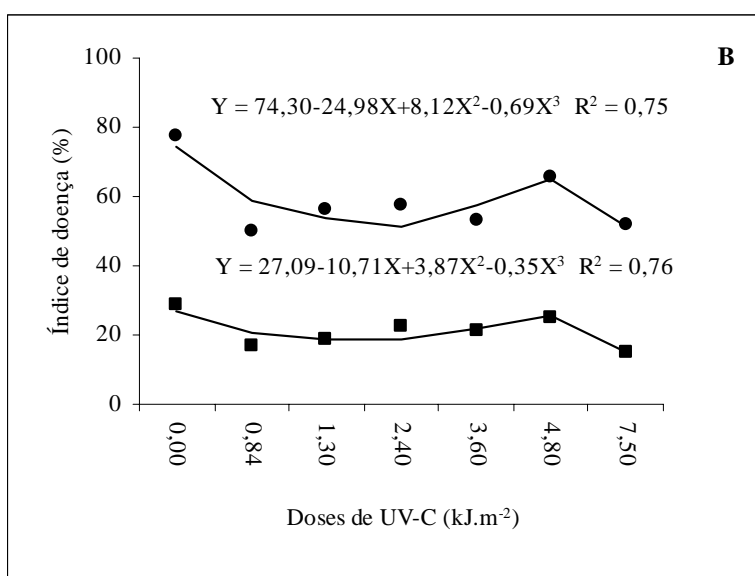
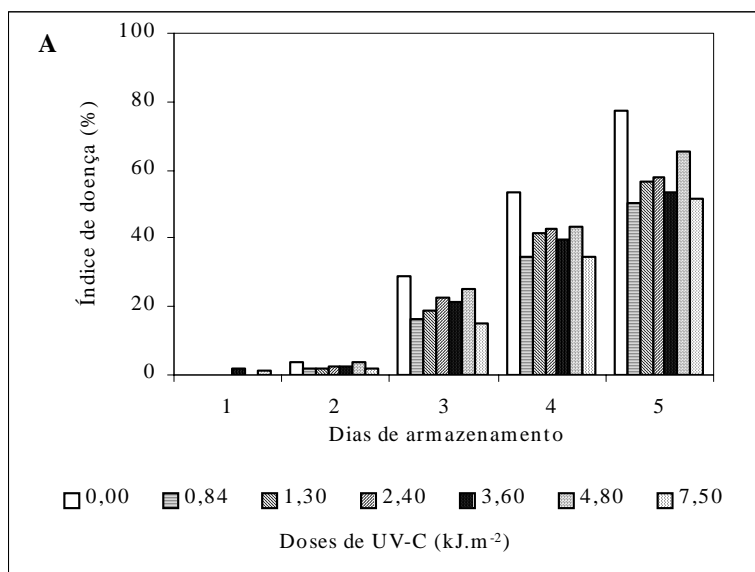
		Intervalo de tempo entre tratamento e inoculação ^y					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
Aparência da ráquis ^x	Com AA	3,20 ^w	3,20	5,00	5,00	4,10 a	ns
	Sem AA	3,20	3,40	4,60	4,80	4,00 a	
	Média	3,20 B	3,30 B	4,80 A	4,90 A		
		**					
C.V. (%)		10,33					
		24 h	48 h	72 h	96 h	Média	
Degrana (%) ^z	Com AA	14,39	3,09	4,38	3,60	6,36 a	ns
	Sem AA	3,38	5,14	3,93	9,70	5,54 a	
	Média	8,88 A	4,11 A	4,15 A	6,65 A		
		ns					
C.V. (%)		55,65					

^w Média de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e, minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey $P \leq 0,05$).

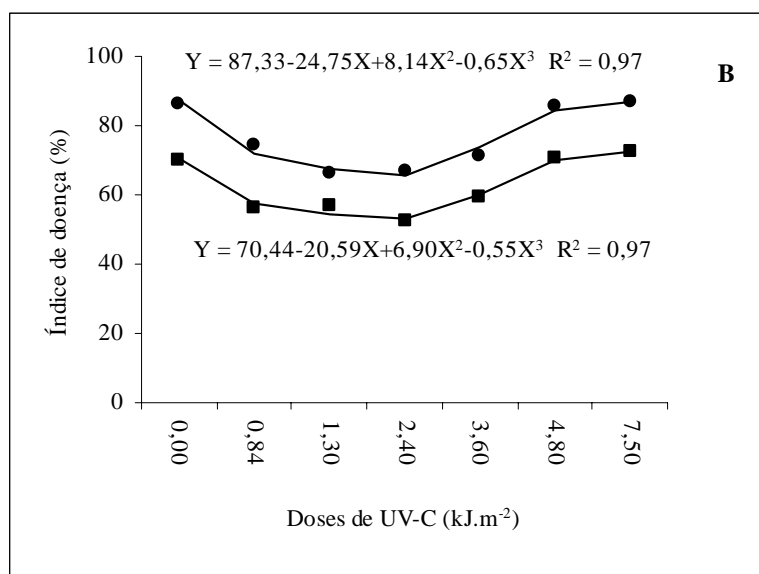
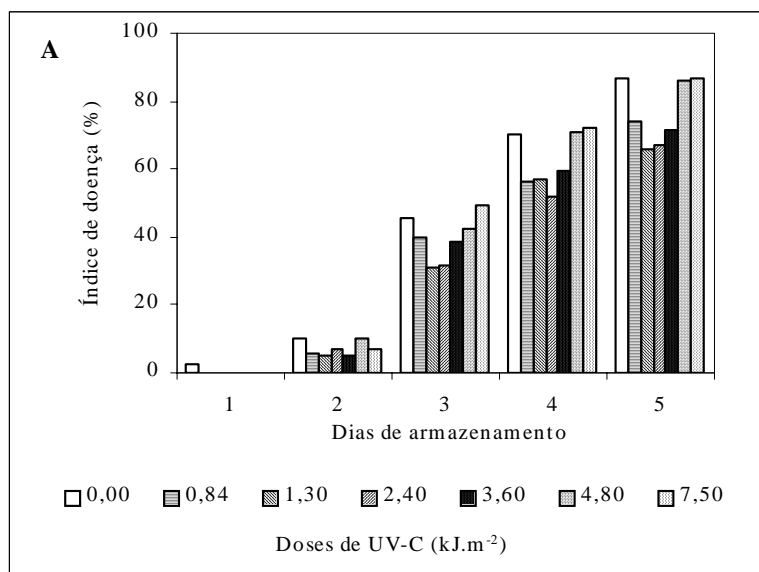
^x 1 = verde, fresco, túrgido, 2 = verde opaco, 3 = verde para marrom claro, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seco.

^y Significância do teste *F* da análise de variância para o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físico-químicos da uva, n.s. = não significativo, *,** = significativo a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

^z Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para análise estatística.



Apêndice 25. Índice de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva 'Itália' tratados com diferentes doses de irradiação UV-C 4 h após a inoculação com o patógeno: (A) dados originais e (B) regressão polinomial (3 (●) e 5 (■) dias após a inoculação). Média de cinco repetições. Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para análise de regressão.



Apêndice 26. Índice de doença causada por *Botrytis cinerea* em cachos de uva ‘Itália’ tratados com diferentes doses de irradiação UV-C 24 h antes da inoculação com o patógeno: (A) dados originais e (B) regressão polinomial (4 (●) e 5 (■) dias após a inoculação). Média de cinco repetições. Dados originais foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para análise de regressão.