**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do
mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole
(*Rhizopus stolonifer*) em uva**

Luiz Rafael Pinto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2013**

Luiz Rafael Pinto
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do
mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole
(*Rhizopus stolonifer*) em uva**

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Pinto, Luiz Rafael

Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em uva / Luiz Rafael Pinto. - - Piracicaba, 2013.

62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Fitotoxinas 2. Controle alternativo 3. CMV 4. ZYMV 5. *Rhizopus stolonifer*
I. Título

CDD 634.82
P659t

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

“Aos meus pais Otavio Carlos Pinto e Sonia Maria Brandolise Pinto e aos meus avós Octavio de Lezier Brandolise (*in memoriam*) e Hedwiges Pietrobon Brandolise, pelo amor, carinho e confiança e incentivo”

“A Deus por abrir todas as portas necessárias”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha namorada Ana Laura Rodrigues Silva pelo amor e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pela oportunidade, orientação, amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Junior pela confiança e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos ensinamentos e cobranças.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que tanto gosto pela oportunidade de me graduar e cursar a pós-graduação.

Aos amigos Rafaela, Caio, Silvia, Dayson, Simone, Sara, Nívea, Kaira, Thiago e Dalilla do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica pelo convívio e amizade.

Aos amigos do Departamento Alécio, Antônio, Guilherme e Renan pela amizade.

Aos demais colegas do Departamento pela amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Aos funcionários do Departamento Fabiana, Jeferson, Edivaldo, Pedro, Liliane, Heloisa, Silvia, Fernanda e Rodolfo.

E finalmente à minha família, meus pais, minha avó, tio José Roberto Brandolise (*in memoriam*), tios Luis Tarciso, Rose, Celso, Sérgio, Simone e meus primos Vinicius, Ana Flávia, Stella e Pedro.

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cucurbitaceas	17
2.2 Uva.....	17
2.3 <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV).....	19
2.4 <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> (ZYMV).....	21
2.5 <i>Rhizopus</i> e a podridão mole.....	23
2.6 Uso de fitotoxinas para o controle de doenças.....	24
2.7 Taxtomina A	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Produção, extração e quantificação da taxtomina A	29
3.2 Otimização de protocolo de produção de taxtomina A	30
3.3 Obtenção das plantas de abobrinha de moita	30
3.4 Obtenção das bagas de uva.....	30
3.5 Obtenção do CMV e ZYMV	31
3.6 Obtenção do isolado de <i>Rhizopus stolonifer</i>	31
3.7 Uso da taxtomina A para o controle do CMV em abobrinha de moita.....	31
3.8 Uso da taxtomina A para o controle do ZYMV-Ri em abobrinha de moita	32
3.9 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	32
3.10 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina A sobre <i>Rhizopus stolonifer</i>	33
3.11 Uso da taxtomina A diluída em água no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'	33
3.12 Uso de taxtomina A diluída em etanol no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Produção, extração e quantificação da taxtomina A	35
4.2 Otimização do protocolo de produção da taxtomina A	37
4.3 Uso da taxtomina A para o controle do CMV em abobrinha de moita.....	38
4.4 Uso da taxtomina A para o controle do ZYMV-Ri em abobrinha de moita	40
4.5 Efeito <i>in vitro</i> da taxtomina A sobre <i>Rhizopus stolonifer</i>	43

4.6 Uso da taxtomina A diluída em água ou em etanol no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'	44
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Taxtomina A no controle dos vírus do mosaico do pepino e do mosaico amarelo em abobrinha de moita e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em uva

Existe uma crescente demanda por alternativas de controle de doenças para se reduzir o uso do controle químico, como por exemplo, o estudo da indução de resistência em plantas, através de fitotoxinas como a taxtomina A e outras substâncias. O vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) e o vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) têm causado grandes prejuízos em culturas importantes, assim como o fungo *Rhizopus stolonifer*, que pode atacar diversos hospedeiros. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar os efeitos do uso da taxtomina A como indutor de resistência em plantas. Como resultado preliminar a produção de taxtomina A pode ser aumentada utilizando-se como fonte de inóculo amostra de uma cultura líquida pré-estabelecida de *Streptomyces scabies*. Foram testados a aspersão de taxtomina A em plantas de abobrinha de moita, para se avaliar a proteção contras os vírus CMV e ZYMV. Também foi aspergida taxtomina A em bagas de uva "Itália" para se avaliar o desenvolvimento da podridão pós-colheita causada por *R. stolonifer*. As plantas de abobrinha de moita, mantidas em casa de vegetação, tratadas com taxtomina A não apresentaram sintomas de mosaico característico do CMV. O teste ELISA apresentou resultados negativos indicando a não presença de partículas virais em níveis detectáveis nas plantas. Com relação ao ZYMV, a taxtomina A não foi capaz de controlar o desenvolvimento da doença, pois apareceram sintomas em todas as plantas. A taxtomina A apresentou efeito *in vitro* sobre *R. stolonifer* retardando o crescimento do fungo principalmente nas duas maiores concentrações usadas. Porém, a aplicação de taxtomina A não foi capaz de proteger as bagas de uva contra o patógeno. Finalizando a taxtomina A foi capaz de controlar em 100% a incidência de CMV em abobrinha, porém não foi capaz de controlar o ZYMV em abobrinha e a podridão nas uvas causada por *R. stolonifer*.

Palavras-chave: Fitotoxinas; Controle alternativo; CMV; ZYMV; *Rhizopus stolonifer*

ABSTRACT

Thaxtomin A on the control of *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) on zucchini squash and the rot (*Rhizopus stolonifer*) on grapes

There is an increasing demand for alternative control of diseases to reduce the use of chemical control, for example the induced resistance studies on plants with phytotoxins like thaxtomin A and other substances. The *Cucumber mosaic virus* (CMV) and the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) cause a lot of losses on important crops and also the fungus *Rhizopus stolonifer* that can cause disease in different hosts. This work was carried out to evaluate the use of thaxtomin A to induce resistance. Thus, as a preliminary result, the thaxtomin A production could be increased by using as inoculum an established *Streptomyces scabies* liquid culture. It was tested the spraying of thaxtomin A on zucchini plants to evaluate the protection against the viruses CMV e ZYMV. On the other hand, grape berries cv “Italia” were also sprayed with thaxtomin A to evaluate the development of the postharvest rot caused by *R. stolonifer*. The zucchini plants were maintained in the greenhouse and the treatment with thaxtomin A inhibited mosaic symptom development by the CMV. The ELISA test showed negative results indicating that there was no detectable virus particles inside the plants. The thaxtomin A was not able to control the ZYMV development since all plants exhibited symptoms. The thaxtomin A showed *in vitro* control of *R. stolonifer* as it reduced the fungal growing at the two highest concentrations used. However, the thaxtomin A was not able to control the postharvest rot in grapes. Finally, the thaxtomin A was able of controlling 100% of the incidence of CMV on zucchini plants, but was not able of controlling ZYMV in zucchini and the grape berrie rot caused by *R. stolonifer*.

Keywords: Phytotoxins; Alternative control ; CMV; ZYMV; *Rhizopus stolonifer*

1 INTRODUÇÃO

As questões relacionadas à conservação ambiental criam uma demanda crescente por métodos alternativos de controle de pragas, como tentativa de se reduzir a aplicação de produtos químicos prejudiciais usados no controle de pragas e doenças. Culturas agrícolas expressivas, como a de plantas pertencentes à família Cucurbitaceae e a viticultura, requerem um grande volume do uso destes pesticidas. A viticultura no Brasil, por exemplo, ocupa uma área de 63 mil hectares, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, e na região nordeste, enquanto que a cultura de cucurbitáceas produz cerca de 350 mil toneladas/ano.

Em consequência do uso contínuo do controle químico surgem patógenos resistentes, o que torna necessário o uso de medidas alternativas para a proteção de plantas contra doenças. Uma alternativa para o controle é a indução de resistência, a qual usa mecanismos naturais da interação planta-patógeno. Nesse contexto, pode-se usar as fitotoxinas, as quais são capazes de induzir resistência.

Alguns vírus fitopatogênicos têm sido responsáveis por grandes perdas econômicas em culturas importantes, por este motivo também têm sido alvo de estudos neste sentido. O vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV), por exemplo, pertencente à família Bromoviridae e ao gênero *Cucumovirus*, infecta um grande número de espécies em comparação a outros vírus pertencente ao mesmo gênero e, sua transmissão se dá através de mais de 60 espécies de afídeos vetores. Por sua vez, o vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) do gênero *Potyvirus* e família *Potyviridae*, pode induzir má formação foliar, deformação e escurecimento dos frutos, sendo considerado um dos vírus mais importantes no cultivo de cucurbitáceas em diversos países.

Na cultura de morango, a espécie *Rhizopus stolonifer* é a principal causadora da podridão de pós-colheita considerada a mais importante na cultura. Além do morango, o fungo pode atacar diversos hospedeiros, como tomate, abobrinha, mandioca e mamão. *R. stolonifer* apresenta micélio bem desenvolvido, hifas cenocíticas, esporângios escuros sustentados por esporangióforos longos, além de rizóides que fixam a hifa ao substrato. O ciclo da doença se inicia quando os aplanósporos, disseminados pelo vento, caem na superfície do fruto. Os esporos de *R. stolonifer* são comuns na atmosfera, e a infecção ocorre principalmente em injúrias ocasionadas durante a colheita e a embalagem.

Dessa maneira, este trabalho foi conduzido com o objetivo de se avaliar os efeitos do uso de uma fitotoxina, denominada taxtomina A, com relação à indução de resistência e o controle de doenças em plantas de abobrinha de moita e bagas de uva. Para isso, foi estudada a aspersão de taxtomina A em plantas de abobrinha de moita para acompanhar a incidência dos vírus CMV e ZYMV, bem como em bagas de uva da variedade “Itália” para se avaliar o controle da podridão mole causada por *R. stolonifer*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cucurbitaceas

As Cucurbitaceae são plantas não proximamente relacionadas a nenhuma outra família de plantas, e a família é constituída por duas subfamílias bem definidas (Zanonioideae e Cucurbitoideae), contendo 118 gêneros e 825 espécies (JEFFREY 1990). Aproximadamente 26 espécies de cucurbitáceas são cultivadas como hortícolas em diversas regiões do mundo (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997)

No Brasil, as espécies com maior importância econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). Segundo Lopes (1991), o cultivo das cucurbitáceas, além do valor econômico exerce também uma função relacionada à geração de empregos diretos e indiretos, pois requer um grande número de mão de obra desde o plantio até a comercialização.

O Instituto de Economia Agrícola (IEA) estimou em 2012 a produção das principais cucurbitáceas no Estado de São Paulo, sendo, as mesmas representadas por melancia, pepino, abobrinha e melão, com uma produção de 181, 75, 56 e 42 mil t, respectivamente. Entre elas, a abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L.) apresenta expressão no Estado de São Paulo, onde se concentram as áreas de maior plantio do país (KOCH, 1995).

As principais espécies cultivadas – melancia, pepino, melão e abóbora – respondem por 20% da produção total de produtos olerícolas no mundo, assumindo uma proporção do total semelhante à das principais Solanáceas, excluindo-se a batata. A melancia é a principal cucurbitácea cultivada no mundo, com cerca de 40% da produção total de cucurbitáceas, seguida do pepino com 27%. Melões e abóboras representam 20% e 12% da produção mundial de membros da família, respectivamente (ALMEIDA, 2002).

2.2 Uva

O cultivo da videira (*Vitis* spp) esteve presente na agricultura desde a antiguidade, desempenhando sempre um papel muito importante na produção de bebidas como o vinho e na composição de diversos alimentos, além disso, seu

consumo *in natura* também é amplo (ALVARENGA et al., 1998). Registros históricos datam a introdução da videira no Brasil, feita pelos colonizadores portugueses, no ano de 1532, na Capitania de São Vicente. Os estudos apontam que Martin Afonso de Souza foi quem inicialmente trouxe a planta ao Brasil (PROTAS et al., 2006).

A uva tem sua origem no Oriente, e pode ser classificada em dois tipos: européia (*Vitis vinifera* L.) do centro da Ásia Central em regiões de clima mediterrâneo, e a videira americana (*Vitis labrusca* L. e outras espécies) do continente norte americano (POMMER e MAIA, 2003). É uma planta perene pertencente à família Vitaceae, que abrange mais de 90 espécies, das quais as de origem americana se destacam pelo seu valor econômico (LARUE e JOHNSON, 1989).

No Brasil, a viticultura ocupa uma área de 63 mil hectares principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, e na região nordeste do país. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característica de regiões temperadas e polos com regiões subtropicais desse modo adotando diferentes estratégias de cultivo uma com período de repouso hibernar definido, e outra com dois ciclos anuais, respectivamente. Estes ciclos são definidos em função de um período de temperaturas mais baixas em que podem ocorrer geadas, e, há também os pólos de viticultura tropical onde é possível a realização de podas sucessivas, com dois e meio a três ciclos vegetativos por ano (SATO, 2004; MELO, 2006).

Os principais Estados produtores de uva no Brasil são: Rio Grande do Sul, São Paulo, Bahia, Pernambuco, Paraná e Minas Gerais (SATO, 2004; MELO, 2006). As áreas cultivadas com uvas de mesa no Brasil têm se expandido muito nos últimos anos (BRACKMAN et al, 2000).

A uva é um fruto não climatérico, ou seja, possui baixa atividade fisiológica, e é muito sensível a desidratação e a infecção fúngica durante o manuseio no período de pós-colheita (ARTÉS-HERNÁNDEZ et al. 2006).

Porém, os fungos patogênicos podem causar grandes prejuízos econômicos nas culturas vinícolas, sendo responsáveis pela maior parte da deterioração pós-colheita dos frutos de uva. Os organismos que causam mais preocupação são os fungos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* (NELSON, 1979).

Associando-se esta vulnerabilidade das bagas, a ampla demanda de produção e as questões relacionadas à conservação ambiental, cria-se uma demanda por métodos alternativos de controle para se reduzir o uso de pesticidas.

Assim, muitos estudos atuais estão voltados para o desenvolvimento destes métodos alternativos que sejam eficientes contra doenças do pré e pós-colheita em uvas e outras culturas agrícolas (ZAHAVI, et al 2000).

2.3 *Cucumber mosaic virus* (CMV)

O vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) é responsável por perdas significativas em muitas culturas no mundo, e, é provavelmente o vírus com a capacidade de infectar um maior número de espécies de plantas diferentes. O CMV mostra uma grande diversidade, ilustrada pelo grande número de isolados, que diferem entre si com relação às suas propriedades biológicas e moleculares. Além disso, a sua facilidade de manipulação faz do CMV um importante modelo de pesquisa, o que inclui transmissão mecânica e forte acúmulo em hospedeiros infectados, e possibilita a fácil purificação de pequenas amostras.

O vírus CMV pertence à família Bromoviridae e ao gênero *Cucumovirus*, que inclui também o *Tomato aspermy virus* (TAV) e o *Peanut stunt virus* (PSV), assim como o vírus recentemente descoberto *Gayfeather mild motile virus* (GMMV), como membro putativo (ADAMS et al., 2009). Em contraste ao TAV e ao PSV, que possuem números de hospedeiros um tanto quanto restritos, o vírus CMV infecta um grande número de espécies.

Em 1991, Edwardson e Christie descreveram 1241 espécies hospedeiras em 101 famílias de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. Isso inclui diversos tipos de cultura com diversas finalidades, como produção de alimentos para o homem e animais, ornamentação, entre outros. Além de diversas espécies selvagens que são responsáveis pela manutenção da fonte de inóculo viral (ROBINSON e DECKER-WALTERS, 1997).

Sua transmissão ocorre através de afídeos vetores de uma forma não persistente, e também através de sementes em algumas espécies como feijão, espinafre, lentilha, tremoço e pimenta (YANG et al., 1997; MAKKOUK e ATTAR, 2003; O'KEEFE et al., 2007; ALI e KOBAYASHI, 2010).

Mais de 60 espécies de afídeos transmitem o vírus, mas *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* são os mais expressivos. Embora não haja evidência da transmissão

desse vírus por sementes em cucurbitáceas, ele pode ser levado através de sementes de diversas outras espécies (JACQUEMOND, 2012).

Assim, os hospedeiros infectados desenvolvem sintomas sistêmicos e sua severidade depende do hospedeiro e do genótipo da partícula viral, sendo que todas as proteínas virais se mostraram envolvidas no desenvolvimento dos sintomas. Apesar de terem sido realizados trabalhos ao nível de proteínas ou DNA, a fim de se determinar as alterações bioquímicas que ocorrem nas plantas infectadas, os mecanismos dos sintomas ainda são pouco entendidos (JACQUEMOND, 2012).

Estes sintomas primeiramente aparecem em folhas jovens com epinastia, as quais tornam-se mosqueadas, retorcidas, enrugadas e de tamanho reduzido. Além disso, a planta apresenta nós internos curtos, resultando em uma roseta. Os frutos apresentam-se deformados, mosqueados, verrugosos e de tamanho reduzido. Caso a infecção seja tardia o desenvolvimento da planta pode não ser afetado, mas o fruto pode apresentar qualidade inferior ou deformações (KUROZAWA, 2005).

O mosaico causado pelo CMV pode ser controlado através do uso de variedades resistentes, porém outra medida para o controle do mosaico é a destruição de plantios velhos e/ou abandonados de qualquer cucurbitácea, feita antes do início da nova cultura, e a eliminação de hospedeiras alternativas dos vetores, contidas na vegetação próxima da área de plantio (KUROZAWA, 2005).

O controle químico dos afídeos vetores através de pulverizações é eficiente apenas para a redução da população de espécies de pulgões que colonizam a cultura, entretanto, geralmente não é eficiente para reduzir a disseminação do vírus dentro da cultura. A eficiência dos inseticidas na redução da incidência de vírus de relação não persistente com o vetor é baixa ou quase nula. Isto pode decorrer do fato de os inseticidas existentes não serem rápidos o bastante para matarem os afídeos antes da inoculação dos vírus na planta.

Assim, a aplicação de inseticidas pode inclusive aumentar a incidência dos vírus de relação não persistente, devido à excitação causada pelos produtos durante as picadas de prova dos afídeos. A pulverização com óleo mineral também não oferece a proteção desejada, podendo inclusive causar fitotoxidez (KUROZAWA, 2005).

2.4 *Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)*

O vírus do mosaico amarelo da abobrinha (*Zucchini yellow mosaic virus* - ZYMV) pertence ao gênero *Potyvirus* e à família *Potyviridae*, possuindo partículas alongadas e flexuosas, medindo aproximadamente 750 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro. Seu RNA é de fita simples, senso positivo, contendo aproximadamente 9600 nucleotídeos. O ácido nucléico codifica uma poliproteína que é clivada por meio de proteases codificadas pelo genoma viral, originando nove proteínas funcionais e uma estrutural. Esta é a proteína capsidial (CP) com massa molecular de 36 kDa (LISA e LECOQ, 1984; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Têm sido descritas variabilidades sorológicas e biológicas para isolados do ZYMV em outros países. Os sintomas induzidos por diferentes isolados variam de intensidade fraca a severa, sendo que alguns isolados podem ocasionar necrose em função da suscetibilidade do hospedeiro (LISA e LECOQ, 1984; DESBIEZ e LECOQ, 1997; LECOQ e PURCIFULL, 1992).

O ZYMV pode ser transmitido de forma horizontal através de afídeos vetores, e também, pode ser transmitido de forma vertical através da infecção de sementes (SIMMONS et al 2013). A transmissão horizontal do ZYMV é feita por diversas espécies de afídeos, sendo a relação entre o vírus e o vetor do tipo não persistente (LISA e LECOQ, 1984). Perring et al. (1992) relataram 9 espécies de afídeos vetoras do ZYMV, dentre elas as espécies *Aphisgossypii glover*, que é praga de algumas cucurbitáceas (GALLO et al., 2002) e *Myzus persicae* (Sulzer), considerada uma das espécies mais eficientes na transmissão de vírus de plantas. A habilidade dos diferentes isolados de ZYMV serem ou não transmitidos por afídeos também têm sido descrita com diferentes variantes (ANTIGNUS et al., 1989; LECOQ et al., 1991; GAL-ON et al., 1992). Por exemplo, o isolado ZYMV-NAT obtido por ANTIGNUS (1989) não é transmissível por afídeos devido a uma mutação na região da proteína capsidial, enquanto o isolado ZYMV-PAT obtido por Lecoq (1991) é transmitido ineficientemente por afídeos, pois apresenta uma forma deficiente da proteína componente auxiliar não estrutural (“helpercomponent proteinase -HCP_{ro}”), sendo que esta proteína, juntamente com a proteína capsidial (CP), propicia a transmissão por afídeos (PIRONE, 1991).

Os estudos sobre a transmissão do ZYMV através da infecção de sementes são conflitantes na literatura (GREBER et al., 1988; SCHRIJNWERKERS et al., 1991;

DESBIEZ e LECOQ, 1997; AL-MUSA, 1989). Dessa forma, a natureza desta modalidade de infecção está sendo estudada atualmente (SIMMONS et al., 2013)

Os hospedeiros experimentais do ZYMV relatados em outros países pertencem a 11 famílias de dicotiledôneas, porém, a infecção natural tem sido observada principalmente em espécies da família Cucurbitaceae (DESBIEZ e LECOQ, 1997). As principais espécies cultivadas dessa família já foram relatadas como sendo suscetíveis ao ZYMV. Na Flórida, E.U.A., o ZYMV foi isolado de *Melothria pendula*, que é uma espécie selvagem perene de cucurbitáceas (ALDLERZ et al., 1983).

Os hospedeiros que não pertencem à família Cucurbitaceae, quando inoculados com o ZYMV, geralmente exibem sintomas localizados ou latentes (DESBIEZ e LECOQ, 1997). Além do mosaico, o ZYMV induz má formação foliar e deformação e escurecimento dos frutos, e é considerado um dos vírus mais importantes no cultivo de cucurbitáceas em diversos países (LECOQ et al., 1991; LISA e LECOQ, 1984; NAMETH et al., 1985; PROVVIDENTI et al., 1984). As plantas infectadas, especialmente abobrinha-de-moita (*C. pepo*), param de produzir frutos em uma ou duas semanas após a infecção, resultando em danos significativos na produção. Estes danos são maiores quanto mais cedo as plantas são infectadas. No Estado da Califórnia, E.U.A., por exemplo, o ZYMV foi responsável por reduções de 40 a 50% na produção de frutos de melão, em uma área de aproximadamente 7.500 ha (NAMETHET al., 1985). No Brasil, Pereira et al. (2007) não obtiveram produção de frutos comerciais em plantas de abobrinha de moita cv. Caserta inoculadas com o PRSV-W e com o ZYMV, isoladamente e em conjunto, aos 5, 15 e 20 dias após a emergência das plantas em campo.

Para o controle do mosaico causado pelo ZYMV em cucurbitáceas recomenda-se incluir principalmente o uso de variedades resistentes ou tolerantes, quando disponíveis e eliminar as plantas que se suspeite serem hospedeiras do vírus e dos afídeos contidas nas proximidades da plantação e na vegetação espontânea. Além disso, é recomendado o uso de substâncias refletoras no solo ou plásticos coloridos (KUROZAWA et al., 2005). No entanto, pulverizações com inseticidas com o intuito de diminuir a disseminação do ZYMV dentro da cultura são de eficiência reduzida, e isso se deve ao fato de os mesmos não serem rápido o suficiente para eliminarem os afídeos antes de ocorrer a inoculação dos vírus na planta.

Foram identificados genes de resistência ao ZYMV em bancos de germoplasma, onde se encontra a espécie selvagem *C. ecuadorensis*, a qual contém genes de resistência para esse potyvirus e tem sido utilizada em programas de melhoramento. Além do mais, a transgenia já foi utilizada com sucesso para o desenvolvimento de plantas resistentes de meloeiro e de abobrinha de moita (FANG e GRUMET, 1993; FUCHS e GONSALVES, 1995).

Estirpes fracas do vírus são utilizadas para pré-imunizar as plantas contra doenças virais. A tecnologia para o controle ZYMV foi primeiramente proposta por Lecoq et al. (1991) na França. Resultados experimentais igualmente promissores foram relatados em Taiwan, na Inglaterra, na Califórnia (Estados Unidos) e no Brasil (WANG et al., 1991; WALKEY et al., 1992; PERRING et al., 1995; RABELO e REZENDE, 2004).

Os sintomas de infecção deste vírus são muito semelhantes aos da infecção por PRSVW, e a dupla infecção não é incomum, assim, a diagnose visual precisa se torna difícil, sendo necessário a utilização de métodos serológicos (ELISA) ou moleculares (RTPCR) para uma diagnose exata, ou ainda a inoculação em plantas indicadoras. No entanto, esses métodos nem sempre estão facilmente disponíveis aos produtores.

2.5 *Rhizopus* e a podridão mole

As podridões moles estão relacionadas a órgãos suculentos da planta, como tubérculos, frutos, bulbos e raízes onde formam-se lesões com manchas cotonosas nas superfícies, e o órgão afetado apresenta perda de consistência, áreas escurecidas e aos poucos vai se liquefazendo. As podridões moles de origem fúngica são causadas por um grande número de espécies pertencentes a diversos gêneros, principalmente os gêneros *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Diplodia* e *Cladosporium* (BEDENDO, 2011)

Na cultura do morango, a podridão de pós-colheita considerada de maior importância é a causada principalmente pela espécie *Rhizopus stolonifer*. Além do morango, o fungo pode atacar diversos hospedeiros, como tomate, abobrinha, mandioca, mamão e outros (BEDENDO, 2011)

R. stolonifer apresenta micélio bem desenvolvido, hifas cenocíticas, esporângios escuros sustentados por esporangióforos longos, além de rizóides que

fixam a hifa ao substrato. O crescimento do micélio deste fungo se dá através de estolões que se fixam ao substrato. O ciclo da doença se inicia quando os aplanósporos, disseminados pelo vento, caem na superfície do fruto. Estes posteriormente germinam e penetram no fruto através de ferimentos (BEDENDO, 2011)

Os esporos de *R. stolonifer* são muito comuns na atmosfera, e a infecção de pêssegos, por exemplo, ocorre principalmente em injúrias ocasionadas durante a colheita e a embalagem (FAN e TIAN, 2000).

Com relação aos procedimentos para o controle das podridões tanto de origem fúngica quanto bacteriana, é necessário evitar os fatores ambientais que propiciam o rápido desenvolvimento da doença, como a alta umidade e a alta temperatura, e a ocorrência de ferimentos (BEDENDO, 2011).

Alguns trabalhos buscam mais alternativas de controle. Lisker et al, (1996), por exemplo, obtiveram relativa eficiência no controle ao aplicar o gás dióxido de enxofre em locais de armazenamento de limão. Entretanto, *R. stolonifer* apresentou maior resistência e demandou uma maior concentração do gás. O etanol teve também sua eficácia demonstrada em limão (SMILANICK, et al ,1995) e foi aplicado em combinação com o aquecimento em frutos do tipo drupa (MARGOSAN et al 1997).

2.6 Uso de fitotoxinas para o controle de doenças

O atual incremento populacional, a necessidade crescente de alimento e o aumento da área cultivada deverão refletir nos problemas fitopatológicos, possivelmente agravando os já existentes e ocasionando o aparecimento de novos. Além disso, o controle químico tradicional das doenças depara-se com o surgimento de isolados de patógenos resistentes as substâncias químicas utilizadas, forçando a busca contínua por novos agentes químicos de controle.

Em razão da conscientização ambiental cada vez maior, a utilização de agroquímicos sem restrições começa a ser repensada e a busca por novas medidas de controle começam a ganhar maior proporção. Nesse contexto, pode-se inserir o controle alternativo, que envolve o controle biológico e a indução de resistência em plantas, embora alguns autores prefiram incluir a indução de resistência sob o âmbito do controle biológico. As medidas englobadas pelo controle alternativo

podem ser visualizadas como de ocorrência natural durante as interações hospedeiro-patógeno (CAVALCANTI et al., 2005).

Com relação à indução de resistência em plantas, as fitotoxinas vêm sendo amplamente estudadas com esta finalidade de controle de doenças. As fitotoxinas são compostos secundários de baixa massa molecular produzidos por fitopatógenos, com a capacidade de afetar o metabolismo da célula hospedeira e/ou sua estrutura, a ponto de causar a sua morte (BERESTETSKIY, 2008). Essas moléculas podem ser vistas como fatores de patogenicidade ou estarem relacionadas a agressividade dos patógenos (MÖBIUS e HERTWECK, 2009; PASCHOLATI et al., 2008).

As fitotoxinas não têm ação enzimática ou hormonal, mas interferem com a seletividade e/ou a estrutura da membrana plasmática, do retículo endoplasmático e das organelas, como mitocôndrias e cloroplastos (PASCHOLATI, 2011). Por outro lado, embora utilizadas pelos fitopatógenos como mecanismo de ataque durante a colonização do hospedeiro, alguns trabalhos evidenciaram a capacidade das fitotoxinas em ativar mecanismos de defesa nas plantas e em alguns casos induzir resistência. Fliegmann et al. (2003) demonstraram que a coronatina, produzida por espécies de *Pseudomonas syringae*, induzia o acúmulo de gliceolinas em cultura de células de soja. Toal e Jones (1999) evidenciaram a possibilidade do controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em *Brassica napus* pelo emprego do ácido oxálico, uma fitotoxina não específica produzida por esse patógeno. Anteriormente, Doubrava et al. (1988) já havia demonstrado a possibilidade da indução de resistência sistêmica em pepineiro, pelo uso do ácido oxálico, contra *Colletotrichum lagenarium*.

Alguns compostos e enzimas podem estar envolvidos com a indução de resistência, como quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, fenóis e as espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, na indução de resistência, quitinases e β -1,3-glucanases podem agir de forma conjunta. As quitinases são enzimas com atividade hidrolítica sobre a quitina. Em plantas, a presença desta enzima está quase que exclusivamente relacionada à defesa (KASPRZEWSKA, 2003). Além da classificação dentro das enzimas hidrolíticas, as quitinases são classificadas como proteínas-RP e dentro dessa classificação, pertencem a classe PR-3 (GUZZO, 2003).

O tipo de quitinase produzido durante a indução de resistência está intimamente relacionado ao estímulo (indutor) ao qual a planta é submetida (KASPRZEWSKA, 2003). Em feijoeiro, raízes infectadas com *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* compatível induziu o processo proteolítico de quitinases (LANGE et al.,

1996), contudo, este processo não foi detectado na reação incompatível ou na interação simbiótica (KASPRZEWSKA, 2003). Em geral, infecção por patógeno incompatível leva a uma maior e mais rápida indução sistêmica e o acúmulo de quitinases, enquanto que, patógenos compatíveis em geral induzem o acúmulo em menor grau e de maneira mais lenta (MEYER et al., 1997). Juntamente com as quitinases, as β -1,3-glucanases representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam sinergisticamente para inibir o crescimento fúngico. Além disso, β -1,3-glucanases liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como eliciadores de defesas do hospedeiro (GUZZO, 2003)

As peroxidases (POXs) são responsáveis por várias funções na defesa celular, participando na lignificação, suberização e metabolismo de parede celular, sendo classificadas como proteínas relacionadas a patogênese (proteínas - RP) (GUZZO, 2003). A reação clássica destas enzimas é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (o-metoxi-fenol) que resulta na formação de radicais fenoxi. A subsequente ligação de radicais instáveis leva a polimerização não enzimática de monômeros e de maneira similar, hidroxicinamil álcool e seus derivados são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, bem como o ácido hidroxicinâmico, contendo grupos funcionais alifáticos, é convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001).

A expressão das POXs também está correlacionada com a ocorrência de infecção por patógenos. O papel destas no processo de defesa é reforçar a parede celular, a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990).

Na indução de resistência, as peroxidases são bastante estudadas devido a sua importância nos processos de defesa, e por estarem diretamente relacionadas à redução da severidade da doença. Iriti e Faoro (2003) destacam o aumento na atividade da peroxidase no processo de defesa do feijoeiro induzido por ASM (acibenzolar-S-metílico) contra *Uromyces appendiculatus*.

Geralmente, os fenóis fazem parte da defesa constitutiva das plantas. Os fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre o patógeno como sobre a célula vegetal e contribuir para a resposta de hipersensibilidade (PASCHOLATI et al., 2008), sendo esta uma resposta celular extrema por parte da planta podendo levar a um alto grau de resistência a doença (PASCHOLATI, 2011).

As espécies reativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species” - ROS), como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (APEL e HIRT, 2004), bem como nos eventos de sinalização durante as interações planta-patógeno (HEISER e OSSWALD, 2008). Em células de plantas, as ROS, principalmente o H_2O_2 , são geradas no citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e espaço apoplástico. As espécies reativas de oxigênio ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas (QUAN et al., 2008).

2.7 Taxtomina A

O gênero *Streptomyces* é conhecido como produtor de compostos secundários biologicamente ativos. A maioria das espécies é saprofítica, porém algumas são importantes patógenos de plantas (LAUZIER et al., 2002).

A sarna da batata, por exemplo, é uma doença bacteriana causada por *Streptomyces*, na qual as fitotoxinas chamadas de taxtominas causam danos ao tubérculo. A doença é causada por três espécies conhecidas como *S. scabies*, *S. acidiscabies* e *S. turgidiscabies* e que são produtoras de taxtomina (LORIA et al., 1997).

Taxtominas são dipeptídeos cíclicos consistindo de uma molécula de triptofano e uma molécula de fenilalanina. A taxtomina de maior produção é a taxtomina A, que é um fator essencial para a patogenicidade da bactéria, pois a toxina reproduz os sintomas da doença. Além disso, a quantidade de taxtomina A aplicada pode ser correlacionada com a severidade dos sintomas. Bactérias mutantes que eram deficientes na produção da fitotoxina não eram patogênicas (LAWRENCE et al., 1990; GOYER et al., 1998).

Um trabalho recente mostrou a possibilidade do uso de uma bactéria endofítica (*Streptomyces* sp.), com deficiência na produção de taxtomina A, para aumentar a resistência contra *S. scabies* em plantas de *Arabidopsis* através da ativação da via do ácido salicílico (LIN et al., 2012).

Devido a dependência da taxtomina A para causar a sarna da batata, a fitotoxina pode ser usada para a seleção de cultivares resistentes em melhoramento genético. WILSON et al. (2010), com o uso da cultura de tecidos e da taxtomina A

como fator de seleção para as células somáticas de batata resistentes a sarna, obtiveram plantas com resistência estável e extrema a sarna da batata.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção, extração e quantificação da taxtomina A

Para a produção e extração da taxtomina A, foi adotada a metodologia utilizada por Garcia (2008), com algumas modificações. O isolado de *Streptomyces scabies*, obtido da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), foi cultivado em meio de extrato de aveia líquido, contido em erlenmeyers de 250 mL. Este meio foi obtido pela adição de 40 g em um litro de água destilada, sendo colocado 100 mL em cada frasco.

Cada erlenmeyer recebeu 3 discos (medindo 0,7 cm de diâmetro cada um), obtidos com furador de rolha, de regiões uniformes e com estruturas de resistência das respectivas colônias do isolado, cultivadas em meio extrato de aveia ágar em placas de petri (28°C; 30 dias; escuro contínuo). A seguir os frascos foram incubados durante 4 dias a 28°C e 150 rpm.

Em seguida, o conteúdo de cada erlenmeyer foi peneirado (peneira comum de uso doméstico) para que se removessem os discos do meio de cultivo. Para a extração da toxina, o filtrado foi transferido para um funil de separação, e a este conteúdo foi adicionado o solvente acetato de etila, na proporção de 3:5 (v/v). A fração referente ao acetato de etila (fase superior) foi coletada, sendo posteriormente desidratada com sulfato de sódio anidro, e em seguida, o solvente evaporado. O pó resultante deste procedimento foi ressuspensão em metanol e armazenado a -20 °C para purificação da taxtomina A.

A purificação foi feita através de TLC (Thin Layer Chromatography – Cromatografia de camada delgada). Foram utilizados os solventes clorofórmio : metanol (9:1 v/v), sendo a corrida de 2h. Logo após foi feita a secagem da placa e, posteriormente foi raspada a banda amarela da placa e o pó resultante foi ressuspensão em metanol. Para separar a sílica, o material foi centrifugado a 12.500 rpm por 2 min em centrífuga de bancada. A seguir foi efetuada a quantificação da toxina através da leitura a 400nm em espectrofotômetro, utilizando-se da proporção de abs. 0,525 = 143 µg/ml de taxtomina A. Essa proporção utilizada foi determinada utilizando-se de amostra de taxtomina A purificada cedida pelo Dr. Russel R. King (Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Fredericton Research Center – Fredericton, Canadá).

Para a verificação da pureza da taxtomina A obtida, a amostra foi injetada em cromatógrafo tipo HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), utilizando-se uma coluna C18 medindo 3,9 mm x 300 mm e contendo sílica com partículas de 10 µm, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, sendo monitorada a 400 nm. Utilizou-se solvente metanol:água na proporção de 4:1 (v/v).

3.2 Otimização de protocolo de produção de taxtomina A

A produção ocorreu conforme o item 3.1, divergindo no acréscimo de uma nova fonte de inóculo que consistiu no uso de diferentes volumes de uma cultura líquida previamente estabelecida de *S. scabies* em meio de extrato de aveia com quatro dias de idade. Foram utilizados quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram representados por três discos de meio de cultivo contendo estruturas de *S. scabies* (controle) e 250, 500 e 1000 µL da cultura previamente estabelecida.

A extração ocorreu conforme o item 3.1, porém, após a evaporação do acetato de etila, o pó resultante foi ressuspensão em 2 mL de metanol para o conteúdo de cada erlenmeyer.

A purificação ocorreu conforme o item 3.1, porém o conteúdo de cada erlenmeyer foi aplicado separadamente na placa de TLC e cada banda obtida foi ressuspensa em 2 mL de metanol.

3.3 Obtenção das plantas de abobrinha de moita

Para a obtenção das plantas de abobrinha de moita foram semeadas três sementes de abobrinha CAC da Sakata[®] (*Cucurbita pepo*) em vasos de alumínio de 1,5 L, contendo solo autoclavado. Após a germinação das sementes foram selecionadas as duas plantas mais vigorosas, sendo a planta restante eliminada.

3.4 Obtenção das bagas de uva

Os cachos de uva, de onde foram retiradas as bagas utilizadas nos experimentos, pertenciam à variedade “Italia” e foram compradas no Ceasa da cidade de Campinas - SP.

3.5 Obtenção do CMV e ZYMV

A fonte de inóculo do CMV foi cedida pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, responsável pelo Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. O CMV estava preservado em tecido desidratado de abobrinha de moita. Para se obter plantas que seriam utilizadas como fonte de inóculo, foram obtidas plantas de abobrinha de moita conforme o item 3.3, as quais foram então inoculadas mecanicamente com o macerado das folhas desidratadas em tampão fosfato (0,02 M; pH 7).

Uma planta de abobrinha de moita contendo o isolado ZYMV-RI foi cedida pelo Prof. Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, sendo que essa planta serviu como fonte de inóculo para a condução do experimento envolvendo o ZYMV.

3.6 Obtenção do isolado de *Rhizopus stolonifer*

O isolado de *R. stolonifer* foi cedido pela Prof. Dra. Lilian Amorin responsável pelo Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. O patógeno foi mantido em meio de cultivo BDA (Oxoid), a 25 °C e escuro constante.

3.7 Uso da taxtomina A para o controle do CMV em abobrinha de moita

A Taxtomina A (20 µg/mL), Bion[®] (acibenzolar-S-metílico; produto comercial da Syngenta[®]) (50 µg/L) e água destilada foram aspergidos quando as plantas, obtidas conforme o item 3.3, apresentavam três folhas (duas cotilédones e a primeira folha verdadeira). Dois dias após a aspersão, as plantas foram inoculadas com 100 µL de inóculo (com uma pipeta) em cada cotilédone previamente polvilhado com carborundum, sendo a inoculação mecânica feita friccionando-se o dedo sobre o cotilédone. O inóculo foi preparado na proporção de 1g de folha com CMV para 50 mL de tampão fosfato (0,02 M; pH 7). Os tratamentos foram os seguintes: taxtomina A (20 µg/mL), Bion[®] e água destilada, sendo que cada tratamento continha plantas inoculadas e não inoculadas totalizando seis tratamentos. Cada tratamento continha 20 plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação do Campo Experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP e

avaliadas com 14 dias após a inoculação, sendo verificadas a presença e ausência de sintomas. No final do experimento, foi realizado o teste de ELISA e o teste de recuperação biológica somente nas plantas assintomáticas. O teste de recuperação biológica consiste em se utilizar plantas assintomáticas como fonte de inóculo, para se verificar a presença ou ausência de partículas virais na planta de interesse, com base nos sintomas expressos.

3.8 Uso da taxtomina A para o controle do ZYMV-Ri em abobrinha de moita

Foi usada a mesma metodologia do item 3.8., sendo que os tratamentos utilizados foram distintos consistindo em taxtomina A diluída em água ou em uma solução de metanol 10%, metanol 10% e água destilada. Cada tratamento foi representado por plantas inoculadas e não inoculadas, totalizando 8 tratamentos com 24 plantas cada. Neste caso, ao final do experimento, a altura das plantas e a biomassa fresca das mesmas também foram avaliadas.

3.9 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para o teste de ELISA foram utilizados antissoros específicos contra as proteínas capsidiais do CMV e do ZYMV. Foram colocados 100 µl das amostras de antissoro, diluídas 1:20 (m/v) em tampão PBS (0,0015 M KH_2PO_4 , 0,14 M NaCl, 0,004 M Na_2HPO_4 , 0,003 M KCl, pH 7,4) em placas de ELISA de 96 células e, posteriormente, incubadas por 16 horas, a 4°C. Foram utilizados duas células para cada amostra.

Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (1L PBS + 0,5 ml Tween). Na etapa seguinte, foram colocados em cada célula 100 µl do antissoro diluído (1:1000; v/v) em tampão Tris-HCl. As placas foram incubadas por 1:30 h, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como no passo anterior.

Em seguida, foram colocados 100 µl do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 (v/v) em tampão Tris-HCl, e incubado novamente por 1:30 h a 37°C. As placas foram lavadas novamente e a seguir foram colocados em cada célula 100 µl de *p*-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8. As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática.

A absorbância de cada uma das células foi medida em leitor de ELISA, utilizando-se um filtro de 405 nm. Extratos de plantas sadias e de plantas sabidamente infectadas com o CMV e com ZYMV foram usados como controles. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor médio de absorbância foi superior a três vezes a média de absorbância do extrato da planta sadia.

3.10 Efeito *in vitro* da taxtomina A sobre *Rhizopus stolonifer*

Para analisar o efeito direto da taxtomina A sobre *R. stolonifer* foram usadas as concentrações de 0, 5, 10, 20 e 50 µg/mL. O meio de cultivo utilizado foi o BDA (Oxoid). A taxtomina A foi adicionada ao meio fundente de modo que para cada concentração utilizada foi feito o cálculo para que o volume da solução adicionada ao meio fosse igual, não alterando assim a proporção de nutrientes entre os tratamentos. Para cada tratamento foram usadas cinco placas de Petri. O fungo foi repicado utilizando-se discos de micélio de 0,7 cm de diâmetro de uma placa com dois dias de idade. As medições do diâmetro da colônia fúngica foram feitas a cada 8h. As placas foram incubadas a 25°C no escuro. Ao final do experimento foi aferida a esporulação, adicionando-se 10 mL de água destilada por placa e fazendo-se a raspagem com uma alça de Drigalski, sendo a contagem dos esporos efetuada em câmara de Neubauer.

3.11 Uso da taxtomina A diluída em água no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'

Para avaliar se o efeito da taxtomina A diluída em água no controle da podridão mole dos frutos de uva após a colheita, foram utilizadas bagas individualizadas de uva 'Itália', pois o espaço físico restrito inviabilizou o desenvolvimento do experimento com cachos inteiros. O experimento foi conduzido conforme Camili et al. (2010) e Abreu et al. (2008), sendo repetido duas vezes.

Cada repetição do experimento continha três tratamentos: água e taxtomina A nas concentrações de 20 e 50 µg/mL. Para cada tratamento, foram usadas sete bandejas, contendo doze bagas cada uma, totalizando 21 bandejas e 252 bagas utilizadas. As bagas foram previamente secas e desinfestadas com hipoclorito de sódio 4:1 (água/hipoclorito; v/v) de forma superficial.

Cada uma das bandejas foi colocada dentro de outra bandeja de poliestireno expandido sobre papel filtro. As bagas foram marcadas na região oposta à inserção da ráquis com caneta para retroprojektor com um círculo, e, então as bagas foram feridas com agulha histológica à 2 mm de profundidade no centro da região marcada. A delimitação da agulha foi ajustada com fita adesiva.

Os frutos foram aspergidos com as soluções e deixados secando a temperatura ambiente durante 16 horas.

A inoculação foi realizada pela pipetagem de 10 µL da suspensão de esporos de *R. stolonifer* sobre o ferimento, sendo a suspensão ajustada para 1×10^5 conídios mL⁻¹ e contendo 0,05% de Tween 20. A suspensão foi obtida de placas de petri com 3 dias de idade adicionando-se água destilada e raspando-se a superfície com uma alça de Drigalski. Aproximadamente 20 mL de água destilada foi adicionada ao papel de filtro disposto na bandeja de poliestireno expandido e, manteve-se cada bandeja fechada com saco plástico umidificado durante 24 horas, em elevada umidade relativa. As bandejas foram mantidas em câmaras de germinação, tipo B.O.D., à 25 °C no escuro sob umidade relativa de $80 \pm 5\%$. As avaliações foram efetuadas a cada 24 horas após a inoculação, sendo feitas avaliações de cada baga, observando-se a incidência da doença.

O ensaio foi instalado formando blocos ao acaso com os três tratamentos e sete repetições, cada repetição contendo uma bandeja com 12 bagas.

3.12 Uso de taxtomina A diluída em etanol no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'

Para se avaliar o efeito da taxtomina A, diluída em etanol no controle da podridão mole dos frutos de uva após a colheita, foi seguida a mesma metodologia do item 3.12, divergindo apenas no numero de tratamentos e repetições.

Cada repetição do experimento continha quatro tratamentos: água, etanol e taxtomina A diluída em etanol nas concentrações de 20 e 50 µg/mL. Para cada tratamento, foram usadas cinco bandejas, contendo doze bagas cada uma, totalizando 20 bandejas e 240 bagas utilizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção, extração e quantificação da taxtomina A

A produção e a extração da taxtomina A foi efetuada utilizando-se a metodologia descrita no item 3.1 e ilustradas nas figuras 1, 2 e 3. A figura 1 apresenta os passos da metodologia de produção e extração da taxtomina A. A figura 2 mostra a corrida da taxtomina A (banda de amarelo intenso indicada pela seta) na placa de TLC, podendo-se notar a presença de outros compostos (bandas) no extrato bruto, evidenciando-se a capacidade de *S. scabies* em produzir diversos compostos (LORIA et al., 1995). O cromatograma, ilustrado na figura 3, indica que a taxtomina utilizada nos experimentos foi purificada por meio da TLC. Portanto, fica evidente que a metodologia utilizada foi eficiente para a purificação da fitotoxina.

Figura 1 - Etapas da produção de taxtomina A. a. Placa com regiões de coloração cinza, que indicam regiões com abundância de esporos, da qual foram retirados 3 discos de meio de cultivo contendo estruturas de *Streptomyces scabies*; b. Aspecto do meio de cultivo sem a adição de *S. scabies*; c. Aspecto do meio de cultivo onde ocorreu a produção de taxtomina A após a repicagem, sendo que o frasco permaneceu durante 4 dias sob agitação constante de 150 rpm a 28°C; d. Separação de fases em funil com a adição de acetato de etila; e. Taxtomina A em acetato de etila

Figura 2 - Placa de TLC com extrato bruto da extração com acetato de etila. A banda amarela, indicada pela seta, corresponde a fração referente a taxtomina A. Solvente – clorofórmio:metanol (9:1; v/v)

Figura 3 - Cromatograma obtido em HPLC ao ser injetada a preparação de taxtomina purificada por TLC. Seta indica o pico e o tempo de retenção para a fitotoxina

4.2 Otimização do protocolo de produção da taxtomina A

A maior produção de taxtomina A foi obtida através da utilização dos volumes de 250 e 500 μL retirados de cultura líquida previamente estabelecida (Figura 4). A produção de taxtomina A, a partir dos discos de meio de cultivo com estruturas de resistência, ocorreu em menor quantidade em relação aos demais tratamentos. Uma possível explicação para a ocorrência desse resultado é a maior atividade metabólica do microrganismo em meio de cultivo líquido. Além disso, quando discos contendo estruturas do fitopatógeno são transferidos para um meio de cultivo líquido existe a necessidade de aumento de biomassa antes da produção de compostos secundários.

WACH et al. (2007) relataram que *S. acidiscabies* somente é capaz de produzir taxtomina A em meios de cultivo que contenham material vegetal, como é o caso do meio de cultivo líquido utilizado no presente trabalho. Esses pesquisadores notaram que a produção de taxtomina A no meio de cultivo de tubérculo de batata foi menos que 5% da produção em meio de aveia.

Figura 4 - Diferenças entre o subcultivo utilizando-se 3 discos de meio de cultivo contendo estruturas de *Streptomyces scabies* e diferentes volumes (250, 500 e 1000 μL) de uma cultura líquida de *S. scabies* previamente estabelecida. $\bar{X} \pm \text{DP}$. Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

4.3 Uso da taxtomina A para o controle do CMV em abobrinha de moita

As plantas tratadas com taxtomina A não apresentaram os sintomas de mosaico característico do CMV (Figura 5; Tabela 1). O ELISA apresentou resultados negativos indicando a não presença de partículas virais em níveis detectáveis dentro das plantas (resultados não mostrados). Além disso, em teste de recuperação biológico, no qual as plantas sem sintomas foram usadas como fonte de inóculo, não ocorreu a transmissão da doença. Isso demonstrou que as plantas estavam completamente livres de partículas virais e que, a aplicação de 20 µL/mL de taxtomina A foi capaz de controlar o CMV.

Esse controle pode ter ocorrido devido a ativação de algum sistema de defesa da planta e/ou em decorrência de ação direta da taxtomina A sobre as partículas virais. Porém, o mais provável é a ativação do sistema de defesa da planta, visto que já foi observada a capacidade de fitotoxinas induzirem resistência (DOUBRAVA et al., 1988; TOAL e JONES, 1999; FLIEGMANN et al., 2003).

A fitotoxina taxtomina A exibe características eliciadoras, induzindo o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo, além de promover o controle da antracnose em plantas de pepino e sorgo e do TMV em fumo (GARCIA et al., 2007; 2008) e induzir a produção de escopoletina em fumo e *Arabidopsis thaliana* (LERAT et al., 2005). Dessa maneira, devido a demonstração da eficiência da taxtomina A em induzir resistência em plantas foi solicitado o pedido de patente de invenção (P.I.0.802.664-5. Revista da Propriedade Industrial – RPI nº 1981, pag. 87. item 2.1. 23/12/2008) por Sérgio Florentino Pascholati e Ely de Oliveira Garcia. Visto que alguns compostos estão envolvidos com a indução de resistência, desse modo faz-se necessária análises bioquímicas para a verificação de alterações no metabolismo da planta de abobrinha de moita, que podem incluir a atividade de quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases e o acúmulo de fenóis e espécies reativas de oxigênio (PASCHOLATI, 2011).

Como foi comentado, fitotoxinas são compostos secundários de baixa massa molecular produzidos por fitopatógenos com a capacidade de afetar o metabolismo da célula hospedeira e/ou sua estrutura, a ponto de causar a sua morte (BERESTETSKIY, 2008). Essas moléculas podem ser vistas como fatores de patogenicidade ou estarem relacionadas a agressividade dos patógenos (MÖBIUS e HERTWECK, 2009; PASCHOLATI et al., 2008). As fitotoxinas não têm ação

enzimática ou hormonal, mas interferem com a seletividade e/ou a estrutura da membrana plasmática, do retículo endoplasmático e das organelas, como mitocôndrias e cloroplastos (PASCHOLATI, 2011). Por outro lado, embora utilizadas pelos fitopatógenos como mecanismo de ataque durante a colonização do hospedeiro, alguns trabalhos evidenciaram a capacidade das fitotoxinas em ativar mecanismos de defesa nas plantas e em alguns casos induzir resistência. Fliegmann et al. (2003) demonstraram que a coronatina, produzida por espécies de *Pseudomonas syringae*, induzia o acúmulo de gliceolinas em cultura de células de soja. Toal e Jones (1999) evidenciaram a possibilidade do controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em *Brassica napus* pelo emprego do ácido oxálico, uma fitotoxina não específica produzida por esse patógeno. Anteriormente, Doubrava et al. (1988) já havia demonstrado a possibilidade da indução de resistência sistêmica em pepineiro, pelo uso do ácido oxálico, contra *Colletotrichum lagenarium*.

A indução de resistência pode induzir respostas antivirais da planta, onde por exemplo, o Bion[®] foi capaz de induzir resistência de plantas de melão contra o CCYV (*Cucurbit chlorotic yellows virus*) (TAKESHITA et al., 2013).

Figura 5 - Plantas de abobrinha de moita inoculadas com CMV. Planta da esquerda representa o controle positivo (inoculada com o vírus CMV), a planta do centro foi tratada com taxtomina A (20µg/mL) e inoculada com CMV e a da direita representa o controle negativo (planta aspergida com água e tampão fostato 0,02 M e pH 7). Plantas com 14 dias de idade

Tabela 1 - Efeito dos tratamentos com ou sem taxtomina A nas plantas de abobrinha de moita, seguidos ou não com a inoculação com CMV. Avaliação realizada 14 dias após inoculação com CMV

Tratamento	% de plantas doentes
Controle positivo (CMV)	100%
Controle negativo (H ₂ O)	0%
Taxtomina A	0%
Taxtomina A + CMV	0%
Bion [®]	0%
Bion [®] + CMV	100%

4.4 Uso da taxtomina A para o controle do ZYMV-Ri em abobrinha de moita

No primeiro experimento, a taxtomina A não foi capaz de controlar o ZYMV, pois todas as plantas apresentaram sintomas da doença (Figuras 6 e 7; Tabela 2). No entanto, na repetição do experimento, das 24 plantas do tratamento taxtomina A diluída em água, nove plantas não apresentaram sintomas do mosaico, porém o teste de ELISA demonstrou que das nove plantas aparentemente saudáveis quatro plantas continham partículas virais (dados não mostrados). Das cinco plantas restantes que não se mostraram positivas para o vírus, mesmo após o teste de ELISA, as mesmas foram submetidas ao teste de recuperação biológico, sendo usadas como fonte de inoculo para plantas saudáveis. Ao final, somente uma planta não continha partículas virais. Desse modo pode-se concluir que a taxtomina A na concentração de 20 µg/mL não foi capaz de evitar o desenvolvimento do ZYMV, o que também pode ser evidenciado nos resultados constantes nas tabelas 3 e 4 e referentes a altura e massa fresca das plantas de abobrinha de moita. Isso pode ter ocorrido em função da divergência entre as interações hospedeiro-vírus, desse modo, não havendo medidas de controle universal (TAKESHITA et al., 2013).

Figura 6 - Plantas de abobrinha de moita inoculadas com ZYMV. Planta da esquerda representa o controle negativo (planta aspergida com água e inoculada somente com tampão fostato 0,02 M e pH 7), a planta do centro foi tratada com taxtomina A diluída em H₂O e inoculada com ZYMV e a da direita é o controle positivo (inoculada com o ZYMV). Plantas com 14 dias de idade

Figura 7 - Plantas de abobrinha de moita inoculadas com ZYMV. Planta da esquerda representa o controle negativo (planta aspergida com água e inoculada somente com tampão fostato 0,02 M e pH 7), a planta do centro foi tratada com taxtomina A diluída em metanol e inoculada com ZYMV e a da direita é o controle positivo (inoculada com o ZYMV). Plantas com 14 dias de idade

Tabela 2 - Efeito dos tratamentos com ou sem taxtomina A nas plantas de abobrinha de moita, seguidos ou não com a inoculação do ZYMV. Avaliação realizada 14 dias após inoculação com ZYMV

Tratamento	Plantas doentes (%)	
	Repetição 1	Repetição 2
Controle positivo (ZYMV)	100%	100%
Controle negativo (H ₂ O)	0%	0%
Taxtomina A em H ₂ O	0%	0%
Taxtomina A em H ₂ O + ZYMV	100%	62,50%
Metanol	0%	0%
Metanol + ZYMV	100%	100%
Taxtomina A em metanol	0%	0%
Taxtomina A em metanol +ZYMV	100%	100%

Tabela 3 – Efeito dos tratamentos com ou sem taxtomina A na altura das plantas de abobrinha de moita, seguidos ou não com a inoculação do ZYMV. Avaliação realizada 14 dias após inoculação com ZYMV

Tratamento	Altura (cm)	
Controle negativo (H ₂ O)	31,42	a
Metanol	31,08	a
Taxtomina A em Metanol	30,96	a
Taxtomina A em Metanol + ZYMV	27,00	b
Taxtomina A em H ₂ O	26,13	bc
Metanol + ZYMV	24,00	bc
Taxtomina A em H ₂ O + ZYMV	23,13	cd
Controle positivo (ZYMV)	20,00	d

Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 4 – Efeito dos tratamentos com ou sem taxtomina A na massa fresca das plantas de abobrinha de moita, seguidos ou não com a inoculação do ZYMV. Avaliação realizada 14 dias após inoculação com ZYMV

Tratamento	Massa fresca (g)	
Controle negativo (H ₂ O)	41,25	a
Taxtomina A em Metanol	37,41	ab
Metanol	35,19	abc
Taxtomina A em Metanol + ZYMV	32,88	bc
Taxtomina A em H ₂ O + ZYMV	31,76	bc
Taxtomina A em H ₂ O	31,71	bc
Metanol + ZYMV	30,78	bc
Controle positivo (ZYMV)	28,54	c

Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

4.5 Efeito *in vitro* da taxtomina A sobre *Rhizopus stolonifer*

A taxtomina A apresentou efeito *in vitro* sobre *R. stolonifer*, pois retardou o crescimento do fungo principalmente nas duas maiores concentrações usadas (20 e 50 µg/mL) (Figura 8). Isso inclusive justificou a escolha das concentrações usadas para o teste *in vivo*. Além do mais, a concentração de 50 µg/mL também foi capaz de reduzir a esporulação do fungo (Tabela 5). Não há relatos na literatura sobre a ação direta da taxtomina A sobre microrganismos. Porém, são conhecidos diversos modos de ação de substâncias capazes de controlar microrganismos podendo-se mencionar os inibidores de mitose, de síntese de ácidos nucleicos, de síntese de proteínas, de respiração, de metabolismo de fosfato, de síntese de ergosterol, disruptores da função da membrana plasmática e inibidores de síntese de parede celular (CARLILE et al., 2001).

Figura 8 - Crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* em meio contendo diferentes concentrações de taxtomina A. Placas mantidas a 25°C no escuro. $\bar{X} \pm DP$

Tabela 5 - Esporulação de *Rhizopus stolonifer* na presença de diferentes concentrações de taxtomina A. Avaliação efetuada após 3 dias

Tratamento (µg/ml)	Concentração (esporos/mL)
0	$6,6 \times 10^5$ ab
5	$7,4 \times 10^5$ a
10	$4,9 \times 10^5$ abc
20	$3,4 \times 10^5$ bc
50	$1,3 \times 10^5$ c

Tratamentos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

4.6 Uso da taxtomina A diluída em água ou em etanol no controle da podridão mole em bagas de uva 'Itália'

O objetivo deste experimento foi o de se avaliar o efeito da aspersão de taxtomina A, efetuada em pré-inoculação nas bagas de uva, na indução de resistência e/ou proteção dos frutos.

A aplicação de taxtomina A não foi capaz de proteger as bagas de uva contra *R. stolonifer* (Figuras 9 e 10). Desta forma, não foi observado efeito indutor ou mesmo efeito direto da fitotoxina sobre o fungo, não havendo controle da doença ou atraso no aparecimento de sintomas. Porém, como já comentado, a taxtomina A exibiu efeito *in vitro* sobre o crescimento de *R. stolonifer* (Figura 8 e Tabela 5)

Mesmo no tratamento representado somente por etanol, o mesmo não foi apto a controlar a podridão mole (Figuras 11 e 12), embora a literatura apresente trabalhos que demonstram a capacidade do etanol em controlar doenças de pós-colheita (LICHTER, et al, 2002, MARGOSAN et al., 1997).

Sarig et al. (1997) notaram a produção das fitoalexinas resveratrol e pterostilbeno, quando bagas de uvas destacadas foram irradiadas com U.V., além do controle de *R. stolonifer* em função da concentração das fitoalexinas. Além do mais, Sarig et al. (1996) observaram a produção de fitoalexinas em uvas tratadas com ozônio.

A aplicação de etanol é considerada um bom substituto para os fungicidas no controle de doenças, visto que o mesmo foi capaz de controlar doenças de pós-colheita em limões (MARGOSAN et al., 1995), uvas (CHERVIN et al., 2005 a e b), *Myrica rubra* e em manga (GUTIÉRRES-ALONSO et al, 2004). O etanol é capaz de efetuar uma desinfestação da superfície do fruto e eliminar o inóculo que causa a podridão mole, no entanto não deixa proteção residual contra reinfecções e não consegue eliminar o patógeno que já penetrou no fruto.

Figura 9 - Evolução da podridão em bagas de uva aspergidas com diferentes concentrações de taxtomina A diluída em água e inoculadas 16 h após aspersão com 1×10^5 conídios mL^{-1} de *Rhizopus stolonifer*. Sinais do patógeno (esporos) podem ser observados sobre as bagas nos dias 3 e 4

Figura 10 - Incidência da podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer* em uvas nas diferentes concentrações de taxtamina A diluída em água. AACPD representa a área abaixo da curva do progresso da doença

Figura 11 - Evolução da podridão em bagas de uva aspergidas com diferentes concentrações de taxtomina A diluídas em etanol e inoculadas com 1×10^5 conídios mL^{-1} de *Rhizopus stolonifer*. Sinais do patógeno (esporos) podem ser observados sobre as bagas nos dias 3 e 4

Figura 12 - Incidência da podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer* em uvas nas diferentes concentrações de taxtomina A diluída em etanol. AACPD representa a área abaixo da curva do progresso da doença

5 CONCLUSÕES

A taxtomina A foi capaz de controlar em 100% a incidência do CMV em abobrinha, porém não foi capaz de controlar o ZYMV em abobrinha e a podridão das bagas de uva causada por *R. stolonifer*;

A taxtomina A foi capaz de reduzir o crescimento de *R. stolonifer in vitro*, dependendo da concentração;

A produção de taxtomina A pode ser aumentada utilizando-se como fonte de inóculo amostra de uma cultura líquida pré-estabelecida.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.M.; LOURENÇO, S.A.; BASSETO, E.; GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C.; AMORIM, L. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 86-88, 2008.
- ADAMS, I.P., GLOVER, R.H., MONGER, W.A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v. 10 p. 537–545, 2009.
- AL-MUSA, A.M. Oversummering hosts for some cucurbit viruses in the Jordan valley. **Journal of Phytopathology**, Berlin , v. 127, p. 49–54, 1989.
- ALDLERRZ, W.C.; PURCIFULL, D.E.; SIMONE, G.W.; HIEBERT, E. *Zucchini yellow mosaic virus*: a pathogen of squash and other cucurbits in Florida. **Proceedings of the Florida state Horticultural Society**, Tallahassee, v. 96, p.72-74, 1983.
- ALI, A.; KOBAYASHI, M. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163 p. 234–237, 2010.
- ALMEIDA, D.P.F. **Cucurbitáceas hortícolas**. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2002. Disponível em: <http://dalmeida.com/hortnet/apontamentos/Cucurbitaceas.pdf> Acesso em: 09 ago. 2013.
- ALVARENGA, A.A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; PEREIRA, A.F. Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.5-8, 1998.
- ANTIGNUS, Y.; RACCAH, B.; GAL-ON, A.; COHEN, S. Biological and serological characterization of zucchini yellow mosaic and watermelon mosaic virus - 2 isolates in Israel. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 17, n. 4, p. 289-298, 1989.
- APEL, K. ; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55 p. 373-399, 2004.

ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes. **Postharvest Biology and technology**, Amsterdam, v. 39, p. 146-154, 2006.

BEDENDO, I. Podridões de órgãos de reserva. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 21, p. 427-434.

BERESTETSKIY, A.O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow v. 44, n. 5, p. 453-465, 2008

BOWLES, J.D. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.59, p.873-907,1990.

BRACKMAN, A.; MAZARO, S.M.; WACLAWOVSKY, A.J. Armazenamento refrigerado de uvas Cvs. Tardia de Caxias e Dona Zilá. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 581-586, 2000.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Vaporização de ácido acético para o controle pós-colheita de *Botrytis cinerea* em uva 'Itália'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 436-443, 2010.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. Fungal cells and vegetative growth. In CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. **The Fungi**. 2nd ed. London, p. 85-184, 2001.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V. ;ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 263 p., 2005.

CHERVIN, C.; BOUZAMBOU, N.; LATCHE, A.; PECH, J.C. Potential for ethanol vapours to limit table grape berry shatter and to limit ethylene evolution from clusters. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 682 p. 513–518, 2005a.

CHERVIN, C.; WESTERCAMP, P.; MONTEILS, G. Ethanol vapours limit *Botrytis* development over the postharvest life of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 319–322, 2005b.

DESBIEZ, C.; LECOQ, H. *Zucchini yellow mosaic virus*. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 46, n. 6, p. 809-829, Dec 1997.

DOUBRAVA, N.S.; DEAN, R.A. ; KUC, J. Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, p. 69-79, 1988.

FAN Q. ; TIAN S.P. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84 p. 1212–1216, 2000.

FANG, G.; GRUMET, R. Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Philadelphia, v.6, p.358-367, 1993.

FLIEGMANN, J.; SCHULER, G.; BOLAND, W.; EBEL, J.; MITHOFER, A. The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 384 p. 437-446, 2003.

FUCHS, M.; GONSALVES, D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus 2* to mixed infections by both potyvirus. **Bio/Technology**, New York, v.13, p.1466-1473, 1995.

GAL-ON, A.; ANTIGNUS, Y.; ROSNER, A.; RACCAH, B. A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. **Journal of General Virology**, London, v.73, p. 2183-2187, 1992.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, E.O. **Resistência de cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à sarna comum (*Streptomyces* spp.) e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo (*Sorghum bicolor*)**: aspectos bioquímicos e ultraestruturais. 92p. 2008. Dissertação (Mestrado (PPG em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” , Universidade de São Paulo, 2008.

GARCIA, E.O.; BIAZOTTO, F.O. ;PASCHOLATI, S.F. Taxtomina A: efeito protetor em plantas de pepino contra antracnose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34 p. 56, 2008. (Resumo).

GARCIA, E.O.; PASCHOLATI, S.F. ; ALMEIDA, M. Potencial eliciador de fitoalexinas e mecanismo de ação da fitotoxina taxtomina A em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 246, 2007. (Resumo).

GREBER, R.S.; PERLEY, D.M.; HERRINGTON, M.E. Some characteristics of Australian isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria , v. 39, p.1085-1094, 1988.

GOYER, C.; VACHON, J.;BEAULIEU, C. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. **Phytopathology**, St. Paul v. 88 p. 442-445,1998.

GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P.; OSUNA-LÓPEZ, S.G.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; BAUTISTA-BAÑOS, S. Influence of ethanol and heat on disease control and quality in stored mango fruits. **Food Science and Technology**, v. 45 (1), p. 20-27, 2012

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

HEISER, I.; OSSWALD, W.F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. ; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular** (). v. 13 São Paulo: Editora Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, 2008.p. 249-282.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, 42, p. 462-468, 2001.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Banco de dados IEA**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/bancodedados.html> Acesso em: 09 ago. 2013.

IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 85 n. 4, p.265-270, 2003. (Special issue).

JACQUEMOND, M. *Cucumber mosaic virus*. In: LOEBENSTEIN, G., LECOQ, H. (Ed.) **Advances in Virus Research**. Maryland Heights, v. 84, p. 439-504, 2012.

JEFFREY, C. Systematics of Cucurbitaceae: an overview. In: BATES, D.M.; ROBINSON, R.W.; JEFFREY, C. (Ed.) **Biology and Utilization of the Cucurbitaceae**. Ithaca, New York: Cornell University Press, p. 3-9, 2009.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KOCH, P.S. **Análise genética de um cruzamento dialélico em abobrinha (*Cucurbita pepo* L.)**. 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

KUROZAWA C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.M.A. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 2005. v 2. cap. 31 p 285-291.

LARUE, J.H. ;JOHNSON, R.S. **Peaches, plums and nectarines**: growing and handling for fresh market, California: Division of Agriculture and Natural Resources, Davis, 252 p., 1989

LANGE, J.; MOHR, U.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; VÖGELI-LANGE, R. Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1135-1144, 1996.

LAUZIER, A.; GOYER, C.; RUEST, L.; BRZEZINSKI, R.; CRAWFORD, D.L.; BEAULIEU, C. Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa. v. 48, p. 359–364, 2002.

LAWRENCE, C.H.; CLARK, M.C.; KING, R.R. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, p. 606–608, 1990.

LECOQ, H.; BOURDIN, D.; RACCAH, B.; HIEBERT, E.; PURCIFULL, D.E. Characterization of a *Zucchini yellow mosaic virus* isolate with a deficient helper component. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1087-1091, 1991.

LECOQ, H.; LEMAIRE, J. M.; WIPF-SCHEIBEL, C. Control of *Zucchini yellow mosaic* virus in squash by cross protection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 2, p. 208-211, 1991.

LECOQ, H.; PURCIFULL, D.E. Biological variability of potyviruses, an example - *Zucchini yellow mosaic-virus*. **Archives of Virology**, New York, p. 229-234, 1992.

LERAT, S.; BABANA, A.H.; OIRD, M.E.; HADRAMI, A.E.; DAAYF, F.; BEAUDOIN, N.; BOUARAB, K.; BEAULIEU C. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 28, p.1895-1903, 2009.

LICHTER, A.; ZUTKHY, Y.; SONEGO, L.; DVIR, O.; KAPLUNOV, T.; SARIG, P.; BEN-ARIE, R. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Farnham Royal, v. 24, p. 301–308, 2002

LIN, L.; GE, H.M.; YAN, T.; QIN, Y.H.; TAN, R.X. Thaxtomin A - deficient endophytic *Streptomyces* sp. enhances plant disease resistance to pathogenic *Streptomyces scabies*. **Planta**, Heidelberg, v. 236, p.1849-1861, 2012.

LISA, V.; LECOQ H. *Zucchini yellow mosaic virus* **CMI/AAB**. Kew Surrey, (**Descriptions of plants viruses**, 282).1984.

LISKER, N.; KEREN-SHACHAM, Z.; SARIG, P.; ZUTKHI, Y.; BEN-ARIE, R. The biology and pathology of the fungus *Rhizopus stolonifer*, cause of black mould disease of table grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Farnham Royal, v. 45, p. 1099-1109,1996.

LOPES, J.F. Palestra de Abertura. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CUCURBITÁCEAS, Campo Grande. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.9, n.2, p.98-99. 1991.

LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; FRY, B.A.; KING, R.R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Plant Disease**. St. Paul, v. 81, p. 836–846,1997.

LORIA, R.; BUKHALID, R.A.; CREATH, R.A.;LEINER, R.H.; OLIVIER, M.; STEFFENS, J.C. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in vitro*. **Phytopathology** , St. Paul , v. 85, p. 537-541, 1995.

MAKKOUK, K.M.; ATTAR, N. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* and *Alfalfa mosaic virus* in lentil seeds. **Arab Journal of Plant Protection**, Beirut, v. 21, p. 49–52, 2003.

MARGOSAN, D.A.; SMILANICK, J.L.; SIMMONS, G.F.; HENSON, D.J. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 1405–1409, 1997.

MELLO, L.M.R. **Mercado brasileiro de uvas e vinhos**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br>. Acesso em: 10 nov. 2013.

MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, Lancaster, v.87, p.588-593, 1997.

MÖBIUS, N.; HERTWECK, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, p. 390-398, 2009.

NAMETH S.T.; DODDS, J.A.; PAULUS, A.O.; KISHABA A. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in southeastern California desert valleys. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, p. 785-788, 1985.

NELSON, K.E. **Harvesting and handling California table grapes for market**. University of California Agricultural Sciences Publication n. 4095, 67 p., 1979.

O'KEEFE, D.C.; BERRYMAN, D.I.; COUTTS, B.A.; JONES, R.A.C. Lack of seed coat contamination with *Cucumber mosaic virus* in lupin permits reliable, large-scale detection of seed transmission in seed samples. **Plant Disease**. St. Paul v. 91, p. 504–508, 2007.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-636.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. ; CIA, P. (Ed.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: Fealq, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 13. p. 627, 2008.

PEREIRA, M.J.Z.; SUSSEL, A.A.B.; SILVA, R.F.; KUHN, O.J.; DOMINGUES, F.; REZENDE, J.A.M. Danos na produção da abobrinha de moita causados pelo *Papaya*

ringspot virus - type W e *Zucchini yellow mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 192-194, 2007.

PERRING, T.M.; FARRAR, C.A.; BLUA, M.J.; WANG H.L.; GONSALVES D. Cross protection of cantaloupe with a mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus*: effectiveness and application. **Crop Protection**, Guilford, v.14, p.601-606, 1995.

PIRONE, T.P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, London, v. 2, p. 81-87, 1991.

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

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A.; MELLO, L.M.R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura>. Acesso em: 12 nov. 2013.

PROVVIDENTI, R.; GONSALVES, D.; HUMAYDAN, H.S. Occurrence of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, p.443-446, 1984.

QUAN, L.J.; ZHANG, B.; SHI, W.W. ; LI, H.Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, West Sussex, v. 50, n.1, p. 2-18, 2008.

RABELO, L.C.; REZENDE, J.A.M. Seleção de uma estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* com potencial para uso na premunização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p. 340-345, 2004.

ROBINSON, R.W. ; DECKER-WALTERS, D.S. What are Cucurbits? In: ROBINSON, R.W.; DECKER-WALTERS, D.S. (Ed.). **Cucurbits Cab International**, New York, cap. 1, p. 1-22, 1997.

SARIG P, ZAHAVI T, ZUTKHI Y, YANNAI S, LISKER N, BEN-ARIE R.. Ozone for the control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48 p. 403-415, 1996

SARIG, P.; ZUTKHI, Y.; MONJAUZE, A.; LISKER, N.; BEN-ARIE, R. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 337–347, 1997

SATO, G.S. Análise do consumo de uva para mesa no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.7, n. 34, p.50-53, 2004.

SCHRIJNWERKERS, C.C.F.M.; HUIJBERTS, N.; BOS, L. *Zucchini yellow mosaic virus*; two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Bari, v.97, p.187-191, 1991.

SIMMONS, H.E.; DUNHAM, J.P.; MUNKVOLD, G.P.; HOLMES, E.C.; STEPHESON, A.G. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. **Virus Research**, Amsterdam, v. 176, p. 259-264, 2013.

SMILANICK, J.L.; MARGOSAN, D.A.; HENSON, D.J. Evaluation of heated solutions of sulfur dioxide, ethanol, and hydrogen peroxide to control postharvest green mold of lemons. **Plant Dis.** St. Paul, v. 79, p. 742–747, 1995

TAKESHITA, M.; OKUDA, M.; OKUDA, S.; HYODO, A.; HAMANO, K.; FURUYA, N.; TSUCHIYA, K. Induction of antiviral responses by Acibenzolar-S-Methyl against *Cucurbit chlorotic yellows virus* in melon. **Phytopathology**, St. Paul, v. 103, p. 960-965. 2013.

TOAL, E.S. ; JONES, P.W. Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 48, p. 759-767, 1999.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Introduction to the species concept in virus taxonomy. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. ; WICKNER, R.B. (Ed.) **Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego:Academic Press, 2000. p. 3–16.

WACH, M.J.; KRASNOFF, S.B.; LORIA, R.; GIBSON, D.M. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 188, p. 81–88, 2007.

WALKEY, D.G.A.; LECOQ, H.; COLLIER R.; DOBSON S. Studies on the control of

Zucchini yellow mosaic virus in courgettes by mild strain protection. **Plant Pathology**, Farnham Royal, v.41, p.762-771, 1992.

WANG, H.L.; GONSALVES, D.; PROVVIDENTI, R.; LECOQ, H.L. Effectiveness of cross protection by mild strain of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucumber, melon and squash. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, n.2, p.203-207, 1991.

WILSON, C.R.; TEGG, R.S.; WILSON, A.J.; LUCKMAN, G.A.; EYLES, A.; YUAN, Z.Q.; CONNER, A.J. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 460-467, 2010.

YANG, Y.; KIM, K. S.; ANDERSON, E.J. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in spinach. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p.924–931, 1997.

ZAHAVI, T.; SCHENA, L.; COHEN, L.; BEN-ARIE, R.; DROBY, S. Biological control of *Botrytis*, *Asperillus* and *Rhizopus* rots of table grapes and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam v. 20, p. 115–124, 2000.