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

**Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e
progresso espaço-temporal da Podridão Mole**

Juliana Silveira Baggio

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

**Piracicaba
2012**

Juliana Silveira Baggio
Engenheira Agrônoma

**Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso
espaço-temporal da Podridão Mole**

Orientador:
Profa. Dra. **LILIAN AMORIM**

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

Piracicaba
2012

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

Baggio, Juliana Silveira

Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da Podridão Mole / Juliana Silveira Baggio.- - Piracicaba, 2012.
78 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Enzimas 2. Epidemiologia 3. Fungos fitopatogênicos 4. Pêssegos
5. Podridão (Doença de planta) 6. Pós-colheita I. Título

CDD 634.25
B144p

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

A Deus, sem O qual nada seria possível!!!

Àos meus pais, Rosângela e Natale:

por todo amor, carinho, apoio e dedicação incondicionais
a mim oferecidos durante toda minha vida.

A minha irmã Mariana:

por todo amor, amizade, incentivo e suporte
nas situações fáceis e difíceis.

Ào Guilherme:

por seu amor, companheirismo, respeito e compreensão
em todos os momentos.

A minha vó Antonia (*in memoriam*):

Que sempre olhou e continuará olhando por mim de onde estiver.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Lilian Amorim, pela orientação e confiança, pelos conhecimentos transmitidos e conselhos dados, pelas oportunidades que me proporcionou e pela convivência agradável do dia-a-dia.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela transmissão do conhecimento e contribuição para minha formação, em especial aos professores doutores Sérgio F. Pascholati e Francisco A. O. Tanaka, pela orientação e suporte durante a realização e condução dos meus experimentos.

Ao professor Dr. Bernhard Hau, da Universidade de Hannover, Alemanha, por ter me acolhido tão bem durante minha estadia e pela valiosa contribuição à análise de dados. A sua esposa Heide pela atenção oferecida durante esse período.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) por minha formação profissional.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica e seus funcionários, em especial a Silvia pela amizade e pelo apoio durante a realização dos experimentos, ao Renato pela ajuda com as avaliações ao microscópio eletrônico e a Fabiana pela orientação durante esse período.

À FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de Mestrado.

A todos os colegas e amigos da Pós-Graduação em Fitopatologia.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia: Antonio, Alécio, Fabrício, Guilherme, Isabela, Juan, Júlio, Timóteo e, em especial, a Ana Raquel, Caroline, Maria Cândida, Paula e Renata pela ajuda com a montagem, condução e avaliação dos experimentos, pelo companheirismo e pelas horas de descontração e divertimento.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica Dalilla, Silvia, Simone e Tiago pela amizade e ajuda indispensável durante as análises realizadas.

Aos amigos que fiz durante minha estadia na Alemanha, Elisabeth, Klaus, Carola e Christian, por terem me recebido com tanto carinho em sua casa.

Ao Guilherme pela ajuda nas viagens para compra de pêssegos e avaliações de experimentos e por todo incentivo e companheirismo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Rosangela e Natale, e minha irmã por todo o amor e suporte durante toda minha vida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 <i>Rhizopus stolonifer</i> e a Podridão Mole em rosáceas de caroço.....	15
2.1.1 Importância.....	15
2.1.2 Agente causal e sintomatologia.....	15
2.1.3 Infecção.....	17
2.1.4 Controle.....	19
2.2 Material e Métodos.....	20
2.2.1 Identificação molecular de <i>Rhizopus stolonifer</i>	20
2.2.2 Avaliação qualitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por <i>Rhizopus stolonifer</i>	22
2.2.3 Avaliação quantitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por <i>Rhizopus stolonifer</i>	24
2.2.4 Ensaios <i>in vivo</i> : Avaliação da disseminação de <i>Rhizopus stolonifer</i> em pêssego.....	26
2.2.4.1 Obtenção dos frutos e desinfestação.....	26
2.2.4.2 Análises físico-químicas.....	26
2.2.4.3 Inoculação de frutos individualizados.....	27
2.2.4.4 Progresso espaço-temporal da Podridão Mole a partir da inoculação de um único fruto.....	28
2.2.5 Efeito de diisopropil fluorofosfato (DIPF) na infecção de pêssegos por <i>Rhizopus stolonifer</i>	32
2.2.6 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por <i>Rhizopus stolonifer</i> ao microscópio eletrônico de varredura.....	34
2.2.7 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por <i>Rhizopus stolonifer</i> ao microscópio óptico.....	35
2.3 Resultados.....	36
2.3.1 Identificação molecular de <i>Rhizopus stolonifer</i>	36
2.3.2 Avaliação qualitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por <i>Rhizopus stolonifer</i>	36

2.3.3 Avaliação quantitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por <i>Rhizopus stolonifer</i>	39
2.3.4 Ensaios <i>in vivo</i> : Avaliação da disseminação de <i>Rhizopus stolonifer</i> em pêssegos.....	41
2.3.4.1 Análises físico-químicas.....	41
2.3.4.2 Inoculação de frutos individualizados.....	43
2.3.4.3 Progresso espaço-temporal da Podridão Mole a partir da inoculação de um único fruto.....	45
2.3.5 Efeito de diisopropil fluorofosfato (DIPF) na infecção de pêssegos por <i>Rhizopus stolonifer</i>	55
2.3.6 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por <i>Rhizopus stolonifer</i> ao microscópio eletrônico de varredura.....	57
2.3.7 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por <i>Rhizopus stolonifer</i> ao microscópio óptico.....	63
2.4 Discussão.....	64
3 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da Podridão Mole

A Podridão Mole, causada por espécies do gênero *Rhizopus*, sendo a espécie *R. stolonifer* a mais comum, é uma das principais doenças pós-colheita de pêssegos. O desenvolvimento do patógeno prejudica a comercialização de pêssegos em mercados atacadistas e varejistas, consistindo em uma das principais causas de rejeição de frutos e da redução do preço de venda da caixa de pêssego. O fungo pode causar podridões em outros frutos e vegetais com níveis similares de perdas. Essa doença está intimamente relacionada à presença de danos físicos ou mecânicos, exemplificados pela presença de injúrias na superfície do fruto, já que *Rhizopus* é conhecido por penetrar seus hospedeiros via ferimentos. Poucos trabalhos investigaram os mecanismos de penetração do patógeno em pêssegos. Alguns concluíram que o fungo não produz enzimas que auxiliem na penetração direta de frutos. No entanto, observações da ocorrência da doença em pêssegos aparentemente não injuriados sugerem que a penetração direta pode ocorrer. A principal medida de controle da doença consiste no manejo cuidadoso dos frutos justamente para evitar ferimentos. O objetivo desse trabalho consistiu em avaliar os mecanismos de penetração de *R. stolonifer* em pêssegos, injuriados ou intactos, e caracterizar o progresso espaço-temporal da Podridão Mole nesses frutos. A atividade de enzimas esterases produzidas pelo fungo foi avaliada qualitativamente, a partir da reação de discos de micélio e suspensões de esporos do patógeno em água ou solução nutritiva em diferentes períodos de incubação (0, 4 e 8 horas) com substrato indoxil acetato, para observação da produção de cristais de coloração azul índigo. Os tratamentos que continham discos de micélio e suspensão de esporos em solução nutritiva, após 8 horas de incubação, adquiriram tonalidades mais escuras de azul, devido à formação de cristais oriundos da reação entre enzimas esterases e substrato. Avaliações ao espectrofotômetro foram conduzidas para determinar a quantidade de enzimas produzidas por *R. stolonifer* quando cultivado em meios com glicose ou cutina, como únicas fontes de carbono. O patógeno foi capaz de crescer em ambos os meios e observou-se maior atividade de enzimas esterases quando o patógeno foi cultivado em meio com cutina. Solução de diisopropil fluorofosfato, inibidor de enzimas cutinases, foi depositada sobre frutos e impediu a manifestação da Podridão Mole em pêssegos inoculados com suspensão de esporos do fungo em solução nutritiva. Pêssegos feridos ou não foram inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água e solução nutritiva para estudo do progresso espaço-temporal da Podridão Mole. Frutos sadios colocados próximos a frutos inoculados artificialmente apresentaram sintomas da doença, a qual se disseminou com mesma taxa de progresso em todos os tratamentos. O processo infeccioso de *R. stolonifer* em pêssegos e nectarinas também foi observado em microscopia óptica e eletrônica de varredura e verificou-se a penetração direta de tecidos intactos pelo fungo. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que *R. stolonifer* é capaz de penetrar diretamente frutos intactos através de esporos germinados em aporte nutritivo externo ao fruto e estolões miceliais. Essas estruturas produzem enzimas esterases, principalmente cutinases, que auxiliam no processo infeccioso.

Palavras-chave: *Prunus persica*; Doenças pós-colheita; Infecção; Enzimas; Epidemiologia

ABSTRACT

Penetration of *Rhizopus stolonifer* on uninjured peaches and spatio-temporal progress of Soft Rot

Soft Rot, caused by *Rhizopus stolonifer*, is one of the main postharvest diseases on peaches. The pathogen development is prejudicial to the stone fruit commercialization in wholesale and retail markets and the disease can cause reduction in the price of peaches, being one of the main causes of fruit rejection. The pathogen has been responsible for causing rots in other types of fruit and vegetables, with similar level of losses. The disease is related to the occurrence of mechanical and physical damages and the presence of injuries on the fruit surface contributes to the infection by *Rhizopus*, which is known as a strictly wound parasite. Few studies have investigated the mechanisms of the pathogen penetration in peaches. Some have concluded that the fungus does not produce enzymes that assist in the direct penetration of fruit. However, observations of disease occurrence on apparently uninjured peaches suggest that direct penetration can occur. Careful management to avoid injuries on the fruit is the most important disease control measure. The objective of this research was to evaluate the penetration mechanisms of *R. stolonifer* on injured or uninjured peaches and characterize the spatio-temporal progress of Soft Rot on these fruit. To determine the esterase enzymes activity, produced by the pathogen, micelial discs and spore suspensions of *R. stolonifer* on water or nutrient solution in different incubation periods (0, 4 and 8 hours) were added to indoxyl acetate solution, to observe the presence of crystals of indigo blue color. The treatments with micelial discs or spore suspensions on nutrient solution, after 8 hours of incubation, showed darker shade of blue, because of the production of crystals from the reaction between the esterase enzymes and the indoxyl acetate. Spectrophotometer evaluations were carried out to determine the amount of enzymes produced by *R. stolonifer* when it was grown on culture media with glucose or cutin, as sole carbon sources. The pathogen was able to grow on both media and higher esterase activity was observed when the fungus was grown on cutin media. Diisopropyl fluorophosphate solution, a cutinase inhibitor, was placed over the fruit and prevented Soft Rot development on peaches inoculated with the fungus spore suspension on nutrient solution. Injured or uninjured peaches were inoculated with *R. stolonifer* spore suspensions on water or nutrient solution to study the spatio-temporal progress of Soft Rot. Healthy fruit placed next to artificially inoculated peaches showed symptoms of the disease, which has spread with the same rate of progress in all treatments. The infectious process of *R. stolonifer* on peaches and nectarines was also studied on optic and scanning electron microscopy and direct penetration of intact tissues by the fungus was observed. The results of this work showed that *R. stolonifer* is capable of direct penetration on uninjured peaches by spores germinated on external nutrient support and by micelial stolons. These structures produce esterase enzymes, especially cutinase, that help in the infectious process.

Keywords: *Prunus persica*; Postharvest diseases; Infection; Enzymes; Epidemiology

1 INTRODUÇÃO

Consideráveis perdas pós-colheita em vegetais ocorrem devido a danos físicos, fisiológicos e patológicos, que podem ocorrer durante a colheita, o transporte e o armazenamento nos mercados ou nas residências dos consumidores. Os danos físicos encontrados em frutos podem constituir porta de entrada para muitos patógenos, principalmente fungos, causando as podridões pós-colheita (AGRIOS, 2005). Os frutos são excelentes substratos ao desenvolvimento de patógenos, devido ao baixo pH, ao alto teor de água e a composição nutritiva, como açúcares, ácidos e vitaminas e, à medida que amadurecem, sofrem várias modificações em sua morfologia e metabolismo, que explicam sua maior suscetibilidade aos processos patológicos desencadeados pelos patógenos (KLUGE et al., 2002).

Frutos de rosáceas de caroço, entre eles o pêssego [*Prunus persica* (L.) Bastch], destacam-se por elevados índices de danos pós-colheita, que podem atingir entre 40 e 50% dos frutos, durante sua comercialização em mercados atacadistas, como por exemplo, na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo – CEAGESP (MARTINS et al., 2006). Entre esses danos, destacam-se as doenças pós-colheita, que possuem correlação positiva com a ocorrência de danos mecânicos que afetam pêssegos (AMORIM et al., 2008). As principais doenças pós-colheita das rosáceas de caroço são a Podridão Parda e a Podridão Mole. A primeira, causada por fungos do gênero *Monilinia*, pode ocorrer tanto no campo como na pós-colheita do fruto, embora os sintomas se expressem apenas em frutos maduros (NERI et al., 2007). A segunda, cujos agentes causais são *Rhizopus stolonifer* e *R. oryzae*, é responsável por grandes danos nos mercados, já que perdas econômicas nos campos dificilmente ocorrem. *R. stolonifer* é a espécie mais facilmente encontrada causando doença em pêssegos (OGAWA, 1995).

A Podridão Mole é caracterizada pela presença de áreas circulares marrons e aquosas nos frutos infectados, as quais liberam substâncias que possuem odor ácido ou fermentado (SNOWDON, 1990). O sinal mais óbvio da ocorrência da doença é a presença de uma massa de micélio de coloração acinzentada, densa e macia crescendo sobre a superfície do fruto, com estolões miceliais longos que se estendem sobre frutos adjacentes, ocorrendo, posteriormente, a formação de esporângios pretos (OGAWA, 1995). Em umidade baixa, *Rhizopus* produz grandes

quantidades de esporos sobre hifas aéreas mais curtas. Já em umidade mais elevada, que é mais facilmente encontrada no interior de embalagens de armazenamento dos frutos, a produção micelial é abundante, enquanto a de esporos é esparsa (OGAWA; ENGLISH, 1991).

Rhizopus é considerado um fungo bastante polífago e causa podridões pós-colheita em numerosos tipos de vegetais e frutos (AGRIOS, 2005), como em batata, berinjela, melancia, melão, pepino (HARTER; WEIMER, 1922), batata-doce (WALKER, 1972), uva (SNOWDON, 1990; TAVARES; SILVA, 2006), morango (MAAS, 1998), framboesa, amora (DAVIS, 1991) e rosáceas de caroço, como pêssago, nectarina e ameixa (OGAWA, 1995). É consenso na literatura que *Rhizopus* penetra seu hospedeiro apenas na presença de ferimento (DAVIS, 1991; MAAS, 1998; HARTE; WEIMER, 1922; OGAWA; ENGLISH, 1991; TAVARES; SILVA, 2006), provavelmente decorrente da incapacidade de produção de enzimas cutinolíticas por suas estruturas vegetativas e reprodutivas (NGUYEN-THE; CHAMEL, 1991). Apesar dessas premissas, em experimentos realizados no Laboratório de Epidemiologia da ESALQ-USP, observou-se que pêssagos sem ferimento tornaram-se infectados quando colocados próximos a frutos doentes. No mesmo laboratório, testes preliminares demonstraram que nectarinas, ameixas e pêssagos não feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução nutritiva reproduziram sintomas da doença, com incidências de 20 a 70% em pêssagos, 20 a 100% em nectarinas, e 10 a 20% em ameixas (dados não publicados). Essas observações sugerem que *Rhizopus* seja capaz de produzir enzimas específicas que degradam a cutícula dos frutos de caroço. De fato, já foi demonstrado que o patógeno pode sintetizar grande quantidade de enzimas que destroem tecidos de plantas (SOMMER et al., 1963), porém nenhuma identificada como degradadora de componentes da cutícula de frutos, que permitisse a penetração direta do patógeno.

Apesar da afirmação generalizada de que a infecção de frutos por *Rhizopus* ocorre unicamente via ferimento, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de penetração do patógeno. Estudos epidemiológicos da Podridão Mole e do progresso espaço-temporal de doenças pós-colheita também não são encontrados na literatura. Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar os mecanismos de penetração de *R. stolonifer* em pêssagos, injuriados ou intactos, e caracterizar o progresso espaço-temporal da Podridão Mole nesses frutos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 *Rhizopus stolonifer* e a Podridão Mole em rosáceas de caroço

2.1.1 Importância

Na CEAGESP, a principal causa da desvalorização e rejeição de frutos ocorre devido à presença de doenças (LIMA et al., 2009). A partir de qualquer indício da presença de podridões na caixa de frutos, seu preço de venda é reduzido mesmo que o fruto com podridão seja descartado e que não haja presença aparente da doença: o atacadista possui consciência de que a doença pode acometer os demais frutos da caixa e que os consumidores reclamarão do preço e devolverão o produto, se este for adquirido pelo preço do fruto sadio (GUTIERREZ, 2005).

Entre os agentes causais de doenças pós-colheita em pêssegos, são mais frequentemente encontrados em caixas de comercialização os fungos *Rhizopus*, *Monilinia* e *Cladosporium*, os quais alcançam incidência de até 15 %, em avaliações realizadas na CEAGESP (MARTINS et al., 2006). A Podridão Mole, por exemplo, causada principalmente por *Rhizopus stolonifer*, é uma das principais doenças pós-colheita em rosáceas de caroço (OGAWA, 1995) e provoca sérias perdas no momento da comercialização.

Caixas de pêssegos que apresentaram 15% de frutos sintomáticos tiveram seu preço reduzido em 9% no mercado atacadista e em 15% no mercado varejista. A redução no valor de preço de venda da caixa de pêssegos na CEAGESP é proporcional ao número de frutos doentes nessa caixa, ou seja, quanto maior a quantidade de frutos doentes, a caixa custará mais barato (LIMA et al., 2009).

De acordo com atacadistas, 60% dos compradores de pêssegos da CEAGESP elegem as doenças pós-colheita como a principal causa de rejeições de frutos e, conseqüentemente, responsáveis pela redução de valor de venda da caixa em até 50% ou mesmo pela devolução do produto (LIMA, 2008).

2.1.2 Agente causal e sintomatologia

Rhizopus é um fungo com alta capacidade saprofítica, habitante de solo muito comum (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011) que pode ser encontrado em materiais vegetais mortos e em decomposição e seus esporos são comumente encontrados na atmosfera (SNOWDON, 1990). Segundo a classificação de doenças

proposta por McNew (1960), esse fungo se insere no Grupo I, ou seja, patógenos que destroem órgãos de armazenamento, com baixa evolução do parasitismo e especificidade e alta agressividade. Eles são capazes de atacar uma gama de diferentes hospedeiros e com grande capacidade destrutiva, que pode levar à morte imediata do hospedeiro (BEDENDO, 2011).

O principal agente etiológico da Podridão Mole, *Rhizopus stolonifer*, pertence ao filo *Zygomycota*, ordem *Mucorales* e família *Mucoraceae* (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011). O fungo, facilmente cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), é sensível a temperaturas menores que 10 °C (AMIRI et al., 2011) e apresenta ótimo crescimento entre 25°C (SNOWDON, 1990) e 27°C (OGAWA, 1995).

Rhizopus cresce rapidamente produzindo micélio branco haplóide, que se torna, com o tempo, de coloração marrom-acinzentada, com hifas asseptadas ou raramente septadas. O fungo produz rizóides amarelos ou marrom-claros, os quais ficam submersos em substrato e a partir dos quais se desenvolvem hifas aéreas, os estolões, que ao tocar o substrato formam novos rizóides (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011). Esporângios, formados a partir de esporangióforos, que possuem rizóides em sua base, são primeiramente hialinos e posteriormente tornam-se escuros, ao se preencherem com esporangiósporos de coloração marrom-escuro a preta que são liberados pela desintegração da parede do esporângio (FISHER; COOK, 2001). Zigósporos podem ser produzidos a partir da reprodução sexuada do fungo, contudo estes não são importantes em causar infecção como os esporangiósporos provenientes da reprodução assexuada e facilmente disseminados pelo ar (MASSOLA JUNIOR; KRUGNER, 2011).

Apesar de *R. stolonifer* ser encontrado em material orgânico no solo, dificilmente observa-se contaminação de frutos ainda nas árvores, já que os mesmos são colhidos antes do ponto de maturidade para serem comercializados. Entretanto, quando há atraso na colheita e os frutos tornam-se maduros, a possibilidade de infecção pelo patógeno aumenta. Frutos caídos, que estão injuriados e em contato com o solo do pomar, entretanto, podem ser infectados com o fungo, o qual geralmente produz muitos esporos o que contribui para disseminação do patógeno pelo ar. Esses esporos podem se depositar em frutos sadios e, ainda, contaminar caixas de colheita, durante essa operação. (OGAWA, 1995). Mais comumente, a infecção no fruto ocorre através de injúrias devido ao manuseio durante a colheita, o

transporte e o armazenamento (SNOWDON, 1990). O patógeno consegue ser disseminado facilmente de fruto para fruto (OGAWA; ENGLISH, 1991).

Os sintomas causados por *R. stolonifer* são caracterizados pela presença de áreas circulares marrons e aquosas no fruto infectado, as quais liberam substâncias de odor ácido ou fermentado (SNOWDON, 1990). É notada, também, uma massa de micélio densa e macia de coloração acinzentada, crescendo sobre a superfície do fruto, que produz longos estolões miceliais, os quais se estendem sobre frutos adjacentes, originando, posteriormente, os esporângios pretos (OGAWA, 1995). O sintoma aquoso no fruto aparece geralmente após dois ou três dias, devido à rápida destruição dos tecidos causada pela grande quantidade de enzimas pécticas responsáveis pela degradação química das células dos frutos (SOMMER et al., 1963; SPALDING, 1963; WELLS, 1968). Cerca de um dia após o aparecimento desse sintoma, surgem estruturas do patógeno, como o micélio e os esporângios com os esporangiósporos.

2.1.3 Infecção

Segundo Ogawa e English (1991), infecções iniciais por *Rhizopus* só ocorrem em superfícies de pêssegos injuriadas. Frutos não injuriados não seriam suscetíveis à infecção pelo patógeno, o qual só consegue penetrar rosáceas de caroço na presença de ferimentos (OGAWA, 1995). Em estudos realizados na CEAGESP, a importância do ferimento para a penetração do patógeno foi constatada pela correlação positiva entre a frequência de frutos de rosáceas de caroço com injúrias mecânicas e a frequência de frutos doentes, isto é, quanto maior a quantidade de frutos danificados mecanicamente maior a incidência de doenças pós-colheita, como a Podridão Mole causada por *Rhizopus* (AMORIM et al., 2008).

Segundo Davis (1991), *Rhizopus* infecta framboesas e amoras danificadas e injuriadas. Para Maas (1998), que descreveu a doença em morangos, o patógeno é estritamente um fungo invasor de ferimentos, que, após o estabelecimento da infecção, secreta uma enzima pectolítica responsável por degradar a lamela média, causando colapso da estrutura celular e deixando o fruto amolecido. Em experimentos realizados com uvas de mesa, ferimentos mecânicos aumentaram drasticamente a suscetibilidade de frutos jovens à infecção por *Rhizopus*. Testes com microscopia eletrônica de varredura foram realizados para observar o processo

de infecção dos frutos pelo patógeno e verificou-se que em frutos injuriados e inoculados artificialmente, o patógeno germinou próximo ao local do ferimento e desenvolveu-se de forma vigorosa no interior e ao redor da fissura, produzindo esporângios (LISKER et al., 1996). Tavares e Silva (2006) também afirmam que *Rhizopus* é capaz de infectar uvas por ferimentos encontrados no pedúnculo e na superfície da baga, por onde os esporos penetram e se desenvolvem. Em batata-doce, cujo primeiro relato de Podridão causada por *Rhizopus* ocorreu em 1890, o fungo consegue penetrar ferimentos de origem natural, ou seja, o fungo penetra através das porções terminais de raízes frescas. Contudo, apesar de ser um parasita estritamente invasor de ferimentos, apresenta dificuldades em infectar raízes de batata-doce através de ferimentos produzidos de forma artificial (WALKER, 1972). Vegetais como melão ‘Cantaloupe’, laranjas e pepinos são prontamente infectados quando esporos e hifas do patógeno são inseridos em ferimento feito com agulha. As estruturas reprodutivas de *Rhizopus* são, aparentemente, incapazes de infectar vegetais na ausência de ferimento (HARTER; WEIMER, 1922). No entanto, depois de estabelecido em um fruto, o fungo consegue invadir frutos adjacentes através dos longos estolões miceliais, causando o sintoma conhecido por nidificação (SNOWDON, 1990).

Apesar das afirmações generalizadas de que *R. stolonifer* penetra seus hospedeiros exclusivamente na presença de ferimentos, estudos preliminares realizados no Laboratório de Epidemiologia da ESALQ – USP sugerem que o fungo seja capaz de causar doenças em frutos não injuriados: seja pela proximidade entre frutos sadios e frutos doentes ou pelo uso de soluções nutritivas (dados não publicados). Alguns autores reportaram que esporos de *R. stolonifer* não germinam na ausência de um aporte nutritivo externo ao fruto (NGUYEN-THE et al, 1989). Em uvas, *Rhizopus* consegue penetrar diretamente superfícies intactas de frutos maduros devido ao extravasamento celular dos tecidos das bagas oriundo das infecções primárias que ocorrem via injúrias (SNOWDON, 1990; TAVARES; SILVA, 2006). Plantas hospedeiras como beterraba e batata doce só podem ser infectadas se os esporos forem germinados em solução nutritiva e crescerem em meio por 24 a 48 horas (HARTER; WEIMER, 1922).

Assim é possível que a incapacidade dos esporos penetrarem diretamente o hospedeiro seja decorrente da sua não germinação na superfície intacta dos frutos e não da falta de produção de enzimas específicas que degradem essa parede. A

produção de enzimas como as esterases, particularmente a cutinase, é essencial para a penetração direta de alguns patógenos como, por exemplo, *Colletotrichum graminicola*, que penetra folhas de sorgo e milho através da liberação de cutinase, promovendo degradação da cutina presente na cutícula das folhas (PASCHOLATI et al., 1993). Outro exemplo de envolvimento da cutinase e outras esterases para fixação de patógeno à cutícula do hospedeiro é de urediniósporos de *Uromyces viciae-fabae* em feijão (DEISING et al., 1992). *Pestalotia malicula* também é capaz de penetrar ameixas diretamente devido à produção das mesmas enzimas (SUGUI et al., 1998). Nesses estudos, essas enzimas foram encontradas em exsudatos e/ou mucilagens de esporos. Apesar dos trabalhos com outros patógenos, raros são os relatos a respeito da existência de enzimas que auxiliem na penetração direta de *Rhizopus* em frutos; a maioria deles se refere às enzimas de estabelecimento do processo parasitário e da colonização do hospedeiro pelo fungo (SPALDING, 1963; WELLS, 1968). O único trabalho que estudou a degradação enzimática de epiderme de nectarinas por *R. stolonifer* afirma que a penetração direta do patógeno aparentemente não envolve enzimas cutinolíticas (NGUYEN-THE; CHAMEL, 1991).

2.1.4 Controle

O controle da Podridão Mole em rosáceas de caroço é considerado uma tarefa bastante árdua, já que o progresso da doença ocorre de forma muito rápida, isto é, em poucos dias o fungo é capaz de colonizar o fruto inteiro e servir de fonte de inóculo para os demais. Existem algumas recomendações para a realização de tratamentos químicos na pré- e na pós-colheita para o controle da doença, como o uso de dichloran ou iprodione (OGAWA, 1995). O uso de cera de carnaúba, aplicada preventivamente, mostrou-se eficiente em reduzir a incidência de Podridão Mole em nectarinas, além de inibir o crescimento micelial e a germinação de esporos de *R. stolonifer* em ensaios *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008). Já os sanificantes cloreto benzalcônico, biomassa cítrica e ozônio não foram eficientes no controle de *R. stolonifer* e da doença quando testados *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (ABREU et al., 2008).

Os métodos mais recomendados para controle da Podridão Mole são aqueles que incentivam cuidados em não causar ferimentos e outras injúrias mecânicas no momento da colheita, transporte e armazenamento, visto que a doença ocorre

principalmente na presença de ferimentos. Outra forma de controle também recomendada consiste no armazenamento de frutos em ambiente refrigerado, em temperaturas inferiores a 4,4 °C, sem que essa cadeia do frio seja quebrada, já que o patógeno é sensível a essas temperaturas (OGAWA, 1995). Entretanto, vale destacar que a produção de frutos de qualidade, ainda no campo, com tratamentos culturais adequados constitui premissa básica para que essa qualidade seja mantida e assegurada pelas boas práticas na pós-colheita (MARTINS et al., 2006), evitando, dessa forma, o desenvolvimento de doenças como a Podridão Mole.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Identificação molecular de *Rhizopus stolonifer*

Ferramentas moleculares foram utilizadas para promover a correta identificação da espécie de *Rhizopus*, usada nos experimentos e proveniente de pêssegos doentes coletados na CEAGESP. Para tanto, realizaram-se extração de DNA, PCR (polymerase chain reaction – reação da polimerase em cadeia) e sequenciamento gênico. Essas análises foram conduzidas no Instituto Biológico, São Paulo – SP, com o auxílio do Dr. Ricardo Harakava.

A extração do DNA foi realizada conforme método do CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). Uma porção de micélio de *R. stolonifer* foi retirada de uma placa contendo meio de cultura BDA e depositada em microtubo. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de tampão de extração CTAB (2% de CTAB, 100 mM de Tris-HCl, pH 8, 20 mM de EDTA, pH 8, 1,4 M NaCl), triturou-se a amostra com um pistilo de plástico e mais 500 µL de tampão de extração CTAB foram acrescentados. As suspensões foram, então, incubadas sob agitação a 65 °C por 10 a 15 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) à amostra, agitou-se o tubo em vortex por alguns segundos e centrifugou-se a amostra a 12000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos. Uma quantia de 500 µL da fase aquosa proveniente dessa centrifugação foi transferida para novo microtubo e a ela foram adicionados 300 µL de isopropanol, misturando-se as suspensões por inversão do microtubo. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 12000 rpm por mais 10 minutos, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente e manteve-se o pellet. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% através de mistura por inversão do microtubo e a amostra foi novamente centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos para

posterior descarte do sobrenadante. Então, para secagem da amostra, primeiramente, inverteu-se o microtubo sobre papel absorvente e, na sequência, colocou-se em centrifuga a vácuo por 5 a 10 minutos. Finalmente, ressuspendeu-se o pellet em 50 µL de água MiliQ estéril e o DNA foi armazenado a 4 °C até o momento de sua utilização.

As amostras de DNA foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS do rDNA. Para as reações de amplificação foram utilizados 1 µL de DNA extraído, 1 µL de cada um dos iniciadores (10 µM), 10 µL de tampão Taq 5X, 1 µL de dNTP (deoxinucleotídeos) (10 mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase e 35,8 µL de água estéril, para um volume final de 50 µL. Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores ITS-1 (5' – TTCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS-4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'). (WHITE et al., 1990).

A reação de PCR foi conduzida em termociclador MJ Research modelo PTC 100 nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos (desnaturação), 54 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 40 segundos (extensão Taq), e com uma extensão final de 72 °C por 4 minutos e mantidas em 4 °C. Em seguida, os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram detectados por eletroforese (0,8 % gel de agarose em tampão TAE 1X), em uma reação de 30 minutos, a 90 mV. Foi utilizado o marcador de tamanho molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. O gel foi corado com solução de brometo de etídio 0,1 µg/ml durante 15 minutos, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com o fotodocumentador Alpha Innotech modelo 1220.

O produto amplificado foi purificado com o Qiaquick PCR purification kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O produto oriundo da purificação do DNA foi utilizado na reação de sequenciamento, baseado no método Sanger (SANGER et al., 1977) de terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos. Utilizaram-se para as reações 2 µL do reagente *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems) (Taq, dNTPs e ddNTPs – dideoxinucleotídeos: nucleotídeo terminador com fluorescência), 0,3 µL dos oligonucleotídeos iniciadores separadamente (primers ITS1 ou ITS4, 10 µM), 6,7 µL do produto de PCR purificado e 1,0 uL tampão de diluição (Applied Biosystems). Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador, em que várias sequências de bases são formadas, com 1, 2, 3, 4 ou mais nucleotídeos. O processo de desnaturação inicial ocorreu a 95 °C por

um minuto, seguidos de 25 ciclos de 95 °C por 10 segundos (desnaturação), 50 °C por 30 segundos (anelamento) e 60 °C por 4 minutos (extensão). Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com 40 uL de isopropanol 75 %, centrifugadas a 4000 G por 30 minutos, lavadas com 100 uL de isopropanol 75 % e ressuspendidas em 10 uL de HiDi Formamida (Applied Biosystems) para serem submetidas a eletroforese em Sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor e, para a construção do diagrama de similaridade e comparação das seqüências, foram utilizadas seqüências obtidas no banco de dados GenBank - NCBI Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1997).

2.2.2 Avaliação qualitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por *Rhizopus stolonifer*

O isolado de *Rhizopus stolonifer*, identificado por técnicas moleculares e mantido no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro foi depositado no centro de uma placa de Petri com BDA, a qual foi mantida em temperatura ambiente, sob luz contínua, por 2 a 3 dias para propiciar o crescimento micelial e esporulação do patógeno. Duas suspensões de esporos de *R. stolonifer* foram preparadas. Em uma delas, adicionou-se 20 mL de água destilada e esterilizada sobre a placa contendo a cultura fúngica e, com auxílio de uma alça de Drigalski, realizou-se a raspagem das estruturas do fungo. A outra suspensão foi preparada com 20 mL de solução contendo 20 g de glicose, 2 g de asparagina, 0,5 g de KH_2PO_4 e 26 g de MgSO_4 em 1 litro de água (modificada de VAN ETEN et al., 1969). Duas concentrações de inóculo foram calibradas em hemocítmetro para ambas as suspensões: 10^5 e 10^6 esporos/mL. Essas suspensões foram usadas imediatamente após seu preparo ou foram mantidas sob temperatura ambiente em agitadores (100 rpm) por 4 ou 8 horas para estimular germinação dos esporos de *R. stolonifer*.

Um isolado de *Colletotrichum graminicola*, conhecido pela produção de cutinase, mantido no Departamento de Fitopatologia e Nematologia, foi cultivado em meio de aveia, da mesma forma como descrita para *R. stolonifer*. Para propiciar o

crescimento micelial, esporulação e produção de mucilagem pelos esporos do fungo, as placas foram mantidas a 21 °C, sob luz contínua, por 10 a 14 dias (PASCHOLATI et al., 1993). A suspensão de esporos foi preparada da mesma forma como descrita para *R. stolonifer*, calibrada em hemocitômetro para 10^5 esporos/mL e usada como controle positivo.

A atividade das enzimas esterases foi avaliada a partir de reação com o substrato indoxil acetato. Para o preparo da solução de indoxil acetato, que deve ser utilizada fresca, foram dissolvidos em 1 mL de acetona, 35 mg de indoxil acetato e, em seguida, adicionou-se 49 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, obtendo-se uma concentração final de 0,7 mg de indoxil acetato por mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 (PASCHOLATI et al., 1993). Depois de preparada, a solução foi mantida em temperaturas entre 0 e 5 °C, no escuro e sem contato com o ar, e adicionada ou não aos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição dos tratamentos analisados: volumes da solução de Tris-HCl e de indoxil acetato, em mL, número de discos de micélio de *Rhizopus stolonifer*, em unidade (un) e volume das suspensões de esporos, em mL, de *Colletotrichum graminicola* ou *Rhizopus stolonifer* em água ou solução nutritiva nas concentrações 10^5 e 10^6 esporos/mL, conferindo um volume final de 4 mL em cada tubo de ensaio

Tratamento	Tris-HCl	Indoxil acetato	Suspensão de esporos de <i>C. graminicola</i>	Disco de micélio de <i>R. stolonifer</i>	Suspensão de esporos de <i>R. stolonifer</i> (esporos/mL)			
					Água		Solução Nutritiva	
					10^5	10^6	10^5	10^6
T ₁	4 mL	-	-	-	-	-	-	-
T ₂	2 mL	2 mL	-	-	-	-	-	-
T ₃	3 mL	-	1 mL	-	-	-	-	-
T ₄	1 mL	2 mL	1 mL	-	-	-	-	-
T ₅	4 mL	-	-	5 un	-	-	-	-
T ₆	2 mL	2 mL	-	5 un	-	-	-	-
T ₇	3 mL	-	-	-	1 mL	-	-	-
T ₈	1 mL	2 mL	-	-	1 mL	-	-	-
T ₉	1 mL	2 mL	-	-	-	1 mL	-	-
T ₁₀	1 mL	2 mL	-	-	-	-	1 mL	-
T ₁₁	1 mL	2 mL	-	-	-	-	-	1 mL

Cada um dos 11 tratamentos foi realizado para cada um dos períodos de incubação: 0, 4 e 8 horas. Após colocação da solução de indoxil acetato, os tubos de ensaio foram mantidos em temperatura ambiente por período de 30 minutos, para propiciar reação entre enzima e substrato. Em seguida, alíquotas de 30 µL dos tratamentos foram transferidas para placas de poliestireno e cobertas com lamínulas para observação, ao microscópio óptico, da formação ou não de cristais insolúveis de cor azul índigo, resultantes da reação entre as enzimas e o substrato utilizado. O experimento foi conduzido três vezes.

2.2.3 Avaliação quantitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer foi cultivado em meio de cultura líquido constituído por 10 g de glicose, 2 g de asparagina, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg de Fe^{+3} , 0,2 mg de Zn^{+2} , 0,1 mg de Mn^{+2} , 5 µg de biotina e 100 µg de tiamina em 1 litro de água (LILLY; BARNETT, 1951). O patógeno também foi cultivado no mesmo meio de cultivo, porém se substituiu a glicose por cutina, que integra a barreira externa de órgãos vegetais e consiste em um poliéster estrutural insolúvel composto por ácidos graxos (KOLATTUKUDY, 1980). A cutina, de maçã, foi utilizada para averiguar a capacidade do fungo em produzir enzimas da família das esterases, especificamente as cutinases, e se desenvolver nesse meio de cultivo, caso conseguisse degradar a cutina. Como controle, cultivou-se o patógeno *Colletotrichum graminicola*, em meios de cultura com glicose e com cutina, como fontes de carbono.

Discos de micélio dos fungos de 0,5 cm de diâmetro foram repicados, separadamente, para erlenmeyers contendo 25 mL de cada um dos meios de cultura líquidos, após autoclavagem e resfriamento dos mesmos. Foram usados três erlenmeyers (repetições) para cada um dos tratamentos e na testemunha não houve adição dos fungos. Posteriormente, os erlenmeyers foram mantidos em temperatura ambiente em agitador (100 rpm) por quatro dias, no caso de *R. stolonifer*, e dez dias no caso do *C. graminicola*, para propiciar o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos.

Após esse período, o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado com auxílio de papel-filtro (Whatman n° 1) e o produto resultante foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm sob temperatura de 4 °C em centrífuga modelo RC5C da Sorvall®

Instruments. Posteriormente, filtrou-se o sobrenadante com o auxílio de uma membrana filtrante, com poro de $0,22\ \mu\text{M}$; o filtrado foi recolhido em microtubos e imediatamente levado para avaliação em espectrofotometria. A presença de atividade de esterases foi avaliada através da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil butirato pelas enzimas presentes nas amostras, e o produto resultante da reação, o *p*-nitrofenol, de coloração amarelada, foi detectado ao espectrofotômetro modelo Hitachi U-2900, em comprimentos de onda de 400 nm.

A mistura da reação para identificar a atividade de esterases foi adicionada a uma das cubetas de vidro usadas no espectrofotômetro e foi composta por 800 μL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, 100 μL de solução estoque de *p*-nitrofenil butirato e 100 μL do filtrado dos meios de cultivo contendo os fungos. A outra cubeta, que funcionou como “branco” ou testemunha, recebeu a mesma mistura, entretanto, o filtrado das amostras era proveniente dos meios de cultura sem os fungos. A solução estoque de *p*-nitrofenil butirato foi preparada no mesmo tampão das reações a uma concentração de 13 mM, para conferir uma concentração final do substrato na cubeta de 1,3 mM.

A reação ao espectrofotômetro foi conduzida por três minutos e a cada 15 segundos, valores de absorbância foram indicados e utilizados para cálculo da variação (Δ) dos valores de absorbância por minuto de reação. Esses valores possuem relação direta com a concentração do produto oriundo da hidrólise do substrato pela enzima esterase e, portanto, relação indireta com a quantidade de enzimas presentes nas amostras. Foram conduzidas seis reações (leituras) para cada um dos tratamentos.

Em seguida, as amostras foram armazenadas em temperatura de $-4\ ^\circ\text{C}$ para posteriormente serem utilizadas na dosagem da concentração de proteínas, a qual foi realizada segundo métodos descritos por Bradford (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino. Seis leituras para cada um dos tratamentos foram realizadas. Dessa forma, foi possível determinar a atividade de enzimas esterases, que foi expressa como variação da densidade óptica por minuto por miligrama de proteína ($\Delta_{\text{OD}}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em cada uma das amostras.

As massas fresca e seca das colônias dos fungos cultivados nos meios de cultura também foram quantificadas após filtragem. A massa seca foi quantificada após a permanência das colônias sobre papéis-filtro no interior de estufa a $50\ ^\circ\text{C}$ por período de uma hora.

Os dados das atividades enzimáticas das amostras e das massas das colônias fúngicas foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

2.2.4 Ensaios *in vivo*: Avaliação da disseminação de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos

2.2.4.1 Obtenção dos frutos e desinfestação

Pêssegos das cultivares ‘Dourado’, ‘Chiripá’, ‘Eragil’ e ‘O’Henry’, provenientes das Centrais de Abastecimento de Campinas S. A. (CEASA – Campinas) ou CEAGESP – São Paulo foram utilizados. Os frutos foram desinfestados superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por três minutos (SOUZA et al., 1999) e deixados para secar em temperatura ambiente para, posteriormente, serem utilizados nos experimentos.

2.2.4.2 Análises físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos coloração da casca, firmeza da polpa e teor de sólidos solúveis foram analisados para caracterizar o estágio de maturação dos frutos e verificar possível correlação com a incidência de Podridão Mole em pêssegos.

A coloração da casca foi avaliada por meio de um sistema de três parâmetros (L^* , a^* e b^*) (MARTIM, 2006), os quais foram determinados com o colorímetro portátil Chroma Meter CR – 400 da marca Konica Minolta, em que L^* define a luminosidade ($L^* = 0$ – preto e $L^* = 100$ – branco) e a^* e b^* são responsáveis pela cromaticidade ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde; $+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul). Estes valores foram convertidos em ângulo de cor, $\lambda^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, indicando o ângulo Hue (λ°) da amostra (0° ou 360° = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde; 270° = azul) (ZHANG et al., 2008). A firmeza da polpa foi determinada com penetrômetro modelo PTR – 100 da marca Instrutherm, com ponteira de 7,9 mm, posicionando-se o aparelho na região equatorial sem casca do fruto, evitando-se a linha de sutura, e expressa em kgf. O teor de sólidos solúveis foi determinado em refratômetro digital Pocket PAL – 1 da marca Atago, e expresso em °Brix.

As análises foram feitas no dia da inoculação dos frutos com *R. stolonifer* e sete dias após, utilizando-se 10 frutos por dia de amostragem em cada experimento. Foram realizadas leituras de coloração da casca e firmeza da polpa em duas faces opostas do fruto, das quais se obteve uma média para cada um dos 10 pêssegos (repetições) utilizados. Para determinar a quantidade de sólidos solúveis, apenas uma leitura foi feita, triturando-se cada um dos 10 frutos e fazendo-se a avaliação.

Os dados dos parâmetros físico-químicos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

2.2.4.3 Inoculação de frutos individualizados

Pêssegos das cultivares 'Dourado' e 'Chiripá', de polpa amarela e branca, respectivamente, foram colocados em bandejas plásticas e todos os frutos foram inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução aquosa ou nutritiva com concentração de 10^5 esporos/mL. Dois experimentos para cada uma das cultivares foram conduzidos.

Os tratamentos utilizados foram: (i) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (ii) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (iii) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva modificada de Van Etten et al. (1969); e (iv) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva. Nas testemunhas, os tratamentos foram os mesmos, entretanto suspensões de esporos do patógeno não foram utilizadas. O delineamento foi totalmente casualizado com 30 frutos (repetições) por tratamento.

A partir das suspensões de esporos obtidas, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foi depositada sobre a região equatorial de cada fruto, uma alíquota de 30 µL da suspensão (Figura 1A), sendo feito um círculo com caneta para identificar o local da inoculação, para evitar possíveis confusões com a ocorrência da doença oriunda de outras fontes de inóculo. Nos tratamentos com ferimento, este foi feito com o auxílio de uma agulha hipodérmica devidamente esterilizada, com 1 mm de diâmetro x 3 mm de profundidade, após a deposição do patógeno sobre os frutos.

Em seguida, para a constituição de uma câmara úmida, foram colocados chumaços de algodão embebidos em água nas bandejas plásticas que foram

fechadas com auxílio de um saco plástico, também umedecido (Figura 1B). Posteriormente, os pêssegos foram incubados em câmaras de crescimento (Incubadora B.O.D) a 25 °C no escuro. A câmara úmida foi removida após 24 horas da inoculação dos frutos, para todos os tratamentos. A incidência (número de frutos doentes) da doença foi avaliada diariamente por quatro dias.

Os dados obtidos com essa avaliação foram transformados pela equação $y = \arcsen\sqrt{p}$ (y corresponde ao arco cujo seno é a raiz quadrada de p), onde y representa os dados transformados e p representa a proporção de frutos doentes. Os dados transformados foram, então, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

Figura 1 – Frutos sendo inoculados com 30 μ L de suspensão de esporos em solução aquosa ou nutritiva (A) e posicionados em bandejas com câmara úmida, constituída por chumaços de algodão embebidos em água e sacos plásticos umedecidos (B)

2.2.4.4 Progresso espaço-temporal da Podridão Mole a partir da inoculação de um único fruto

Pêssegos das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’ foram colocados em bandejas plásticas e somente o fruto que se encontrava na posição central desse recipiente foi inoculado (Figura 2A) com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer*. Vinte e cinco frutos, dispostos em cinco linhas, cada qual com cinco pêssegos, foram utilizados e dois experimentos para cada uma das cultivares foram conduzidos (Tabela 2).

Os tratamentos utilizados foram: (i) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (ii) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (iii) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em solução

nutritiva; e (iv) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva. Os tratamentos testemunha não receberam os esporos do patógeno.

A montagem dos experimentos foi realizada conforme descrito anteriormente. Entretanto, diariamente, durante 12 dias, foi avaliada a quantidade de frutos não inoculados com a suspensão de esporos que se tornaram doentes (incidência) e também a área de tecido doente de cada fruto (severidade), devido à dispersão do patógeno proveniente do fruto inoculado.

Tabela 2 – Suspensões de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água ou solução nutritiva inoculadas em pêssegos com ou sem ferimento, delineamentos experimentais e número de frutos utilizados nos experimentos *in vivo* conduzidos com pêssegos das cultivares 'Dourado', 'Chiripá', 'Eragil' e 'O'Henry'

Tratamento	Cultivar	Delineamento Experimental ⁽¹⁾	Número de frutos	Suspensão de esporos	Ferimento ⁽²⁾
T ₁	Dourado	Fruto central	25	Água	+
T ₂	Dourado	Fruto central	25	Água	-
T ₃	Dourado	Fruto central	25	Solução nutritiva	+
T ₄	Dourado	Fruto central	25	Solução nutritiva	-
T ₅	Chiripá	Fruto central	25	Água	+
T ₆	Chiripá	Fruto central	25	Água	-
T ₇	Chiripá	Fruto central	25	Solução nutritiva	+
T ₈	Chiripá	Fruto central	25	Solução nutritiva	-
T ₉	Eragil	Fruto central da primeira coluna	91	Água	+
T ₁₀	O'Henry	Fruto central	77	Água	+

⁽¹⁾ Posição do fruto no delineamento inoculado com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer*

⁽²⁾ Sinais + e - representam, respectivamente, tratamentos em que os frutos foram feridos ou não com agulha.

Três experimentos foram conduzidos com pêssegos da cultivar 'O'Henry', de polpa amarela, importados da Argentina, os quais foram colocados sobre plástico-bolha em prateleiras de estantes no interior de salas climatizadas a 25 °C no escuro. Foram utilizados 77 frutos, dispostos em sete linhas, cada qual com 11 frutos. Apenas o fruto central, correspondente ao sexto fruto da quarta linha, foi ferido e inoculado com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água com concentração de 10⁵ esporos/mL (Figura 2B e Tabela 2). O tratamento testemunha não recebeu os esporos do patógeno. Em seguida, para a constituição da câmara úmida, que foi mantida por 24 horas, foram colocados chumaços de algodão embebidos em água

ao redor dos frutos inoculados, sobre os quais se depositou uma bandeja plástica umedecida. Diariamente, durante 18 dias, foi avaliada a quantidade de pêssegos não inoculados com a suspensão de esporos que se tornaram doentes e também a área de tecido doente de cada fruto que se tornava infectado, devido à dispersão do patógeno proveniente do fruto inoculado.

Três experimentos, implantados e avaliados conforme descrito anteriormente, em salas climatizadas, foram conduzidos com pêssegos de polpa amarela da cultivar 'Eragil'. Entretanto, utilizaram-se sete linhas de frutos, cada qual com 13 pêssegos e apenas o primeiro fruto da quarta linha foi inoculado com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução aquosa (Figura 2C e Tabela 2).

Figura 2 – Esquema dos experimentos conduzidos com cinco linhas com cinco frutos cada e inoculação do fruto central (A); sete linhas, cada qual com 11 pêssegos e inoculação do fruto central (B); e com sete linhas de frutos, cada qual com 13 pêssegos e inoculação do fruto central da primeira coluna (C). Círculos hachurados cheios correspondem aos frutos inoculados com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer*

Para cada um dos experimentos conduzidos, foi computada a quantidade diária de frutos doentes, obtendo-se a porcentagem de incidência diária. As análises dos dados dos pêssegos que se tornaram infectados com *R. stolonifer* com o decorrer do tempo foram realizadas por meio de regressão não-linear com o auxílio do programa Statística 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), utilizando-se o modelo logístico, descrito pela equação: $y = 1/(1+\exp^{-(a+b*t)})$, em que y representa a proporção de

frutos doentes (incidência), t corresponde ao tempo de avaliação, em dias, e a e b correspondem, respectivamente, aos coeficientes linear e angular, ou seja, ao ponto que representa o intercepto do eixo da incidência e ao ponto que corresponde à taxa de progresso da doença (MADDEN et al., 2007). Essa equação foi ajustada ao aumento do número de frutos doentes com o decorrer do tempo. Dessa forma, a velocidade de crescimento e desenvolvimento da doença foi avaliada a partir de curvas de progresso da doença para cada tratamento de cada uma das cultivares de cada experimento.

No caso da análise da severidade da doença sobre os frutos, levaram-se em consideração as variáveis tempo, em dias de avaliação, e distância, em número de frutos, de cada um dos pêssegos dispostos nas bandejas ou prateleiras (diferentes arranjos) em relação à fonte primária de inóculo, isto é, ao fruto inoculado artificialmente com suspensão de esporos do patógeno. Assim, com o decorrer dos dias de avaliação, cada um dos pêssegos que se encontravam em uma determinada posição em relação ao inóculo primário foi avaliado quanto à porcentagem de tecido doente. Fez-se uma média dos valores de severidade dos frutos que se encontravam à mesma distância do pêssego inoculado artificialmente em cada um dos dias de avaliação. Assim, aliando-se tempo e espaço na avaliação do progresso da severidade da Podridão Mole em pêssegos, procedeu-se a análise estatística.

Análises de regressão não-linear dos dados da severidade da doença em frutos com o decorrer do tempo e no espaço foram conduzidas também com o auxílio do programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA). Foi utilizado modelo logístico com quatro parâmetros, representado pela equação: $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$, em que y representa a área de tecido doente do fruto (severidade); x corresponde à distância, em frutos, em relação ao pêssego inoculado artificialmente; t representa o tempo de avaliação, em dias; a corresponde ao coeficiente linear, ou seja, ao intercepto do eixo da severidade; b representa o parâmetro do modelo referente ao tempo; c corresponde ao coeficiente referente à distância; e d refere-se ao parâmetro do modelo que mostra a interação entre tempo e espaço/distância (MADDEN et al., 2007).

Com o uso desse modelo, considera-se que há uma interação entre espaço e tempo que interfere na forma de propagação do patógeno. Isto é, a forma do gradiente ou curva que relaciona a distância, é variável com o tempo e, assim, a velocidade com a qual a doença está se movimentando para longe do foco primário

deve ser considerada. A velocidade não é constante e pode ser expressa pela seguinte equação: $\partial t / \partial x = (b + d \cdot t) / (c - d \cdot x)$, em que t é igual a tempo, x é a distância, b corresponde ao parâmetro referente ao tempo, c , referente ao espaço ou distância e d , ao parâmetro do modelo que mostra a interação entre tempo e espaço/distância.

A adequação dos modelos matemáticos aos dados de incidência e severidade foi analisada pelos coeficientes de determinação (R^2), obtidos das regressões não-lineares de cada um dos experimentos e cultivares.

Os diferentes tratamentos utilizados, bem como os experimentos conduzidos com as mesmas cultivares nos mesmos arranjos experimentais, foram comparados segundo o “dummy model”, também conhecido como “dummy variable”. Através dessas análises, podemos comparar experimentos ou tratamentos dois a dois, admitindo que um deles receba o valor 0 (zero) e o outro, o valor 1 (um) para indicar a presença ou ausência de algum efeito categórico que possa ser esperado no resultado, isto é, para verificar se há diferença entre os parâmetros dos diferentes tratamentos, cultivares, experimentos. Assim, essa variável, denominada “D” multiplica a variação dos parâmetros (p. ex. Δa , Δb , Δc e Δd), os quais são somados aos parâmetros respectivos das equações descritas anteriormente, conforme o caso de análise, como exemplo: $y = 1 / (1 + e^{(-(a + D \cdot \Delta a) - (c + D \cdot \Delta c) \cdot x + (b + D \cdot \Delta b) \cdot t + (d + D \cdot \Delta d) \cdot x \cdot t))})$ (MADDEN et al., 2007). Ao realizar-se a análise estatística, com o uso de modelos não-lineares, é verificado se há significância nessas variações. Se os valores de Δ forem estatisticamente iguais a zero, não há diferença entre os tratamentos ou experimentos ou cultivares. Entretanto, se for diferente de zero, há diferença.

2.2.5 Efeito de diisopropil fluorofosfato (DIPF) na infecção de pêssegos por *Rhizopus stolonifer*

O produto químico diisopropil fluorofosfato (DIPF) constitui um inibidor de enzimas da classe das serina hidrolases, incluindo as esterases e as proteases (COHEN et al., 1967). Dessa forma, é capaz de bloquear a atividade da enzima cutinase (PASCHOLATI et al., 1993). A influência de DIPF na morfologia e germinação de esporos de *Rhizopus stolonifer* e na infecção de pêssegos pelo patógeno foram avaliadas em placas de poliestireno e em pêssegos inoculados com o fungo. Suspensões de esporos do fungo foram preparadas em solução nutritiva (modificada de Van Etten et al., 1969) e ajustadas para concentração final de 10^5

esporos/mL. Uma solução estoque de DIPF na concentração 200 μ M foi preparada a partir da adição do produto comercial (Sigma-Aldrich®) em tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,0.

Alíquotas de 20 μ L de suspensão de esporos de *R. stolonifer* foram depositadas sobre placas de poliestireno e receberam 20 μ L da solução estoque de DIPF previamente preparada. O tratamento testemunha continha apenas suspensão de esporos do patógeno (40 μ L). Foram usadas quatro alíquotas por placa e três placas por tratamento, as quais foram mantidas no interior de gerboxes contendo papel filtro umedecido. Após 24 horas, foram adicionadas às alíquotas 10 μ L de lactoglicerol para estagnar a germinação e, posteriormente, lamínulas foram colocadas para realização da contagem dos esporos germinados ou não ao microscópio óptico. Foram contabilizados os 100 primeiros esporos.

Pêssegos, desinfestados superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (SOUZA et al., 1999), foram transferidos para o interior de bandejas plásticas e submetidos aos seguintes tratamentos: (i) 40 μ L de suspensão de esporos de *R. stolonifer*; (ii) 20 μ L de suspensão de esporos do fungo e 20 μ L de solução de DIPF (100 μ M) no momento da inoculação; (iii) 20 μ L de suspensão de esporos do patógeno e 20 μ L de solução de DIPF uma hora após inoculação; (iv) 20 μ L de suspensão de esporos do fungo e 20 μ L de solução de DIPF duas horas após inoculação; (v) 20 μ L de suspensão de esporos do patógeno e 20 μ L de solução de DIPF quatro horas após inoculação; (vi) 20 μ L de suspensão de esporos do fungo e 20 μ L de solução de DIPF seis horas após inoculação; (vii) 40 μ L de solução nutritiva sem esporos do patógeno; (viii) 20 μ L de solução nutritiva sem esporos do fungo e 20 μ L de solução de DIPF (100 μ M).

A avaliação da incidência de Podridão Mole nos frutos foi realizada após três dias da inoculação com o patógeno. Os pêssegos foram considerados sintomáticos quando apresentaram áreas marrons e encharcadas no local de deposição da suspensão de esporos. Foram utilizados cinco frutos (repetições) por tratamento e dois experimentos foram conduzidos. Os dados obtidos com essa avaliação foram transformados pela equação $y = \arcsen\sqrt{p}$ (y corresponde ao arco cujo seno é a raiz quadrada de p), onde y representa os dados transformados e p representa a proporção de frutos doentes. Os dados transformados foram, então, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, no programa Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

2.2.6 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por *Rhizopus stolonifer* ao microscópio eletrônico de varredura

Pêssegos e nectarinas, desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio, foram inoculados com 30 µL de suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* na concentração 10^5 esporos/mL segundo os tratamentos: (i) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (ii) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em água; (iii) frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva; e (iv) frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva. Os tratamentos testemunha não receberam os esporos do patógeno. Foram utilizados três frutos (repetições) por tratamento. Após inoculação com o patógeno, os frutos foram mantidos em recipientes plásticos, umedecidos com água destilada, no interior de câmaras de crescimento a 25 °C no escuro.

Após períodos de 8, 12 e 18 horas, com auxílio de um bisturi, fragmentos desses frutos foram coletados da região de deposição da alíquota e colocados sobre lamínulas de vidro no interior de placas de Petri contendo papel filtro umedecido, para constituição da câmara úmida, e uma tampa de microtubo de 1 mL, sobre a qual se depositaram 30 µL de solução de tetróxido de ósmio a 2%. A placa foi vedada com parafilme e envolvida com papel alumínio, sendo mantida por um período de aproximadamente 24 horas no interior de uma capela. Antes da submissão à fixação com o vapor de ósmio, pipetaram-se 30 µL de solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,2 e CaCl_2 0,001M) sobre as amostras coletadas após 18 horas da inoculação, para paralisar o crescimento fúngico excessivo sobre o fruto durante o processo de fixação. Na sequência, as amostras foram colocadas em recipientes hermeticamente fechados contendo sílica gel em seu interior para secagem do material, por no mínimo 24 horas. Posteriormente, foram coladas em suportes de alumínio, denominados “stubs”, com auxílio de fita de carbono dupla face e, então, procedeu-se a metalização com vapor de ouro em equipamento Balzers modelo MED 010 (Balzers Unions, Lichtenstein), a 50 mA, por 180 segundos. Finalmente, a visualização das amostras foi feita ao microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP).

2.2.7 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por *Rhizopus stolonifer* ao microscópio óptico

Pêssegos e nectarinas foram inoculados com 30 µL de suspensões de esporos de *Rhizopus stolonifer* na concentração 10^5 esporos/mL segundo os tratamentos: frutos feridos inoculados com suspensão de esporos em água e frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva. Os tratamentos testemunha não continham esporos do patógeno e foram utilizados três frutos (repetições) por tratamento. Após inoculação, os frutos foram mantidos em recipientes plásticos umedecidos, no interior de câmaras de crescimento a 25 °C no escuro por 12 horas.

Após esse período, porções dos frutos foram coletadas da região de deposição da alíquota com o auxílio de um bisturi, transferidas para microtubos de 1,5 mL, contendo solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,2 e CaCl_2 0,001M) e armazenadas em geladeira por período mínimo de 24 horas. Na etapa seguinte, conhecida por desidratação, a solução fixadora foi removida dos microtubos e as amostras foram submetidas a soluções de concentração crescente de etanol: 30, 50, 70, 90 e 100%, permanecendo pelo menos 50 minutos em cada uma das etapas, com exceção da solução de 70% em que as amostras permanecerem por um período de 3 horas. Ao término das desidratações, foram feitas mais duas passagens de 50 minutos cada pela concentração de 100%, para garantir a total desidratação dos tecidos. Em seguida, as amostras permaneceram em etanol 100% e resina, na proporção 1:1, na geladeira por 24 horas e, posteriormente, em resina pura (historresina + pó ativador) por mais 24 horas em geladeira. Com o término desse período, as amostras foram transferidas para formas especiais, nas quais permaneceram por no mínimo 48 horas e, após endurecimento da resina, foram coladas em suportes de madeira e colocadas em recipientes hermeticamente fechados contendo sílica gel em seu interior para secagem do material, por no mínimo quatro dias.

Após secagem do material, os blocos de resina contendo as amostras foram levados ao micrótomo (Leica RM 2235), no qual foram submetidas a cortes com espessura de 5 µm. Esses cortes foram depositados em lâminas de vidro contendo água, as quais foram submetidas à secagem em chapa quente para fixação dos

cortes à lâmina. Em seguida, essas lâminas foram coradas com corante azul de toluidina por aproximadamente dois minutos e lavadas em água corrente por quatro a cinco minutos. Após o procedimento de coloração das amostras, as lâminas permaneceram em condições ambiente para secagem por 24 horas. Então, lamínulas, sobre as quais se adicionou verniz Etellan®, foram depositadas sobre as lâminas, as quais foram mantidas em condições ambiente, por dois a três dias, para fixação das amostras. Finalmente, a visualização das amostras foi feita em microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 com câmera MRc 3).

2.3 Resultados

2.3.1 Identificação molecular de *Rhizopus stolonifer*

O patógeno utilizado nos experimentos foi identificado como *Rhizopus stolonifer*. A sequência obtida para *R. stolonifer* foi comparada com sequências de outros isolados registrados no GenBank: EU622265 *Rhizopus stolonifer* isolate NW643, AF117935 *Rhizopus stolonifer* ATCC 14037 e AF117936 *Rhizopus stolonifer* ATCC 6227A. A sequência obtida para *R. stolonifer* foi:

```

1 CTGCAATCAC TTGCACTTCT GATCATTGAT TGCACCAATG AAAAAAGAAT TTATTTAAAA
61 ACTCTCTTTC ATTATTCTTT GTTCTCTCCC TTCTTGCATA ATCGTTATAA TACCAAGTAA
121 ATAAATTTAA TAGAGTATTA ACTACACAAA AAGGAGAAAA AAAAAAAAAA AAGTTGAAAA
181 ACCCTTTTTT TTTTTTTTAA TTTTTTTGGG GGGGCCAAAT TTAATAAAAA ACCCAAATT
241 TTGCCAATTT TAAAAGCCT TTTTCCCCT TTTTTTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
301 AAGCCCCCTT TTTTTTTTTC CCCCAAATTT ATTTTTTTTAA AAAAAAAAAA AAAATCGGGG
361 GGGGGTTTTT TTAAAATGG AAGAGGGGTT TTTCCCGGAA AACCATAGGG GGGGGGGGGG
421 GTCAAAAATT GGGGAACCCC GAATTTGGAA TTCCCCCGTT TCGGCTTTTG TACTTCTCCT
481 GGAGGCGAAA AAAAAAACCG TTAAAAGTG TTTTTATTTT AAAAATTTAC GGATTTCGGG
541 GTTATTTGTG GAGCTTAACG CTTATAACC TTTCAGGCAA ATGGGGGAGG AGGGGGGTGG
601 GGCATCCGGT AAGGCTTCCT TAGCTCTACC GCACGTATAC CCCTGTTCCA TAAAGATGGT
661 GATGAGATAA AAAAGAGCAC GTTTTTTTTT CTCCCTCAGA GAAGTCTCGA CAAAGAAAAA
721 CCTTTAAGC GCGAAAAACC GGTTGTCCTT ATGTGGCCCA CACGCTCGGA GCGGT

```

2.3.2 Avaliação qualitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por *Rhizopus stolonifer*

Diferenças de coloração foram observadas após 30 minutos da colocação do substrato indoxil acetato nos tratamentos testados. A coloração azul representa que

houve reação entre o substrato e as enzimas esterases presentes nas amostras, demonstrando-se a presença de atividade dessas enzimas (Figura 3).

Apesar de o tratamento em que se adicionou somente o tampão Tris-HCl e a solução de indoxil acetato ter apresentado coloração azul, esta foi de tonalidade mais clara que nos demais tratamentos (Figura 3B).

Os tratamentos em que os fungos *Colletotrichum graminicola* e *Rhizopus stolonifer* foram adicionados ao substrato coloriram-se de azul, apesar das diferentes tonalidades da cor. Os tratamentos em que se utilizaram discos de micélio (Figura 3F) e nos quais se usaram suspensões de esporos de *R. stolonifer*, em água (Figura 3G, I, K) ou em solução nutritiva (Figura 3H, J, L), quando submetidos à solução de indoxil, apresentaram diferentes tons de azul. No caso dos tratamentos com suspensão de esporos de *R. stolonifer* na concentração 10^6 esporos/mL, o tom de azul mais escuro foi obtido quando se utilizou a solução nutritiva e se manteve as suspensões em agitador por 8 horas (Figura 3L), visto que essas situações possibilitam maior porcentagem de germinação de esporos quando comparadas à suspensão em solução aquosa (Figura 3K).

As suspensões de esporos de *R. stolonifer* em concentração menor (10^5 esporos/mL), quando adicionadas ao substrato indoxil acetato, apresentaram coloração semelhante àquelas de maior concentração (dados não apresentados).

Figura 3 – Tratamentos submetidos à análise qualitativa da atividade de enzimas esterases: tampão Tris-HCl (A); tampão Tris HCl e solução de indoxil acetato (B); suspensão de esporos de *Colletotrichum graminicola* em tampão Tris-HCl (C); suspensão de esporos de *C. graminicola* em tampão Tris-HCl e solução de indoxil acetato (D); discos de micélio de *Rhizopus stolonifer* em tampão Tris-HCl (E); discos de micélio de *R. stolonifer* em tampão Tris-HCl e solução de indoxil acetato (F); suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água com concentração de 10^6 esporos/mL em tampão Tris-HCl e solução de indoxil acetato com 0 (G), 4 (I) e 8 (K) horas de incubação; suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução nutritiva com concentração de 10^6 esporos/mL em tampão Tris-HCl e solução de indoxil acetato com 0 (H), 4 (J) e 8 (L) horas de incubação

Apesar da centrifugação e da filtragem das amostras, alguns esporos de *R. stolonifer* estavam presentes nas alíquotas e pode-se observar, tanto no interior dos esporos como em torno dos mesmos, a formação de cristais de cor azul índigo. Visualmente, verificou-se que, quando se manteve a suspensão com concentração 10^6 esporos/mL por 8 horas sob agitação para a promoção da germinação, houve maior formação de cristais azuis (Figura 4A), tanto em solução aquosa como nutritiva. Entretanto, maiores taxas de germinação são observadas quando se fornecem nutrientes ao fungo através da solução nutritiva. Assim, quanto maior o período de incubação das suspensões, maior a porcentagem de germinação e maior

a atividade enzimática. Observou-se, também, formação de cristais ao redor dos conídios de *C. graminicola* (Figura 4B), devido à reação enzimática. No tratamento em que não se adicionou solução de indoxil acetato (Figura 4D) e aquele em que se utilizou tampão Tris-HCl e se adicionou o substrato (Figura 4C), não houve formação dos cristais, visto que não havia, respectivamente, substrato ou enzimas com as quais o indoxil acetato pudesse reagir.

Figura 4 – Suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água na concentração de 10^6 esporos/mL com 8 horas de incubação (A), conídios de *Colletotrichum acutatum* (B) e solução de Tris-HCl (C) após 30 minutos do acréscimo de solução de indoxil acetato; suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água sem adição do substrato (D). A reação enzimática que possibilitou a formação de cristais de coloração azul índigo (setas) ocorreu na presença de esporos dos fungos em substrato indoxil acetato

2.3.3 Avaliação quantitativa da atividade de enzimas esterases produzidas por *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer e *Colletotrichum graminicola* cresceram e se desenvolveram, em quatro e dez dias, respectivamente, nos meios de cultivo contendo glicose ou cutina como fontes de carbono (Figura 5). Esse fato demonstra

que esses fungos produzem enzimas capazes de degradar substâncias complexas para aquisição do carbono, fonte de energia para seu metabolismo.

Figura 5 – Estruturas vegetativas e reprodutivas de *Rhizopus stolonifer* cultivado em meios de cultura com cutina (A, C) e glicose (B, D), como fontes de carbono, antes (A, B) e após (C, D) filtragem em papel filtro Whatman n°1

Os maiores valores de massa fresca foram obtidos quando os fungos foram cultivados em meio com glicose e *R. stolonifer* apresentou um crescimento mais vigoroso que *C. graminicola*. No entanto, aquele perdeu mais água que este o que fica evidenciado pelos menores valores de massa seca (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores das massas seca e fresca, em gramas, das colônias dos fungos *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum graminicola*, cultivados em meios de cultura contendo glicose ou cutina como fontes de carbono

	Massa (g) ⁽¹⁾	
	Fresca	Seca
<i>Rhizopus stolonifer</i>		
Glicose	5,97 A	0,65 C
Cutina	4,50 C	0,56 C
<i>Colletotrichum graminicola</i>		
Glicose	4,99 B	0,85 B
Cutina	3,91 D	1,01 A

⁽¹⁾ Valores obtidos pela média de três repetições (erlenmeyers).

Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade de enzimas da família das esterases, da qual a cutinase é membro, foi determinada para *C. graminicola* e *R. stolonifer*. Os valores da atividade enzimática, em meio de cultura contendo glicose e cutina como fontes de carbono, para *C. graminicola* foram de 0,198 e 0,140 $\Delta_{OD}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente, enquanto para *R. stolonifer* esses valores foram de 0,011 e 0,044, respectivamente. Esses valores representam a quantidade de enzimas esterases existentes e em atividade entre todas as proteínas determinadas pelo método descrito por Bradford (1976).

C. graminicola apresentou maiores valores de variação de densidade óptica do que *R. stolonifer* quando cultivado em ambos os meios de cultura, isto é, possui mais enzimas esterases em atividade. Quando os valores das atividades enzimáticas de *R. stolonifer* foram comparados aos valores de *C. graminicola*, os valores obtidos para os meios com cutina e com glicose foram estatisticamente iguais entre si. Entretanto, quando comparados somente entre si, houve diferença estatística e a atividade de esterases foi cerca de quatro vezes maior quando *Rhizopus* foi cultivado em meio de cultura contendo cutina como fonte de carbono.

2.3.4 Ensaios *in vivo*: Avaliação da disseminação de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos

2.3.4.1 Análises físico-químicas

A cultivar ‘Chiripá’ apresenta cor de casca mais clara que a cultivar ‘O’Henry’, com um valor de L^* mais elevado e as cultivares ‘Dourado’ e ‘Eragil’ apresentam

colorações de casca estatisticamente iguais a das outras cultivares (Tabela 4). Os pêssegos das cultivares ‘Eragil’ e ‘O’Henry’ têm a casca mais avermelhada que aqueles das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’, evidenciados pelos maiores valores de a^* . Sete dias após instalação dos experimentos, os frutos da cultivar ‘Dourado’ se tornaram mais avermelhados que os da cultivar ‘Chiripá’, evidenciado pelos valores mais elevados de a^* (Tabela 4). Os valores encontrados para b^* , indicativo de coloração amarela, foram maiores na cultivar ‘Dourado’ que na cultivar ‘Chiripá’ no dia da inoculação dos frutos com o patógeno e sete dias após a instalação dos experimentos. Essas cultivares apresentaram também amarelecimento da casca com o decorrer dos dias, com maiores valores de b^* . (Tabela 4).

Os valores do ângulo Hue encontram-se, em média, entre 0° e 90° , o que evidencia que os pêssegos possuem coloração entre tons de vermelho e amarelo, em ambos os dias de avaliação. Após sete dias da instalação dos experimentos, apesar da semelhança estatística, os valores dos ângulos decrescem em relação ao primeiro dia. Esse fato demonstra que, com o amadurecimento dos frutos, estes tendem a ter coloração mais avermelhada. Apesar de não haver diferença estatística, para as variedades ‘Eragil’ e ‘O’Henry’, os valores do ângulo Hue estão mais próximos de 0° do que para as demais cultivares, fazendo com que a coloração se aproxime mais de tons de vermelho (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios de L^* , a^* e b^* e ângulo Hue de coloração da casca de pêssegos das cultivares ‘Dourado’, ‘Chiripá’, ‘Eragil’ e ‘O’Henry’, zero e sete dias após inoculação dos frutos

Cultivar	Dias após inoculação							
	0				7			
	L^*	a^*	b^*	Ângulo Hue	L^*	a^*	b^*	Ângulo Hue
Dourado	58,5Aab ⁽¹⁾	9,2Ab	41,0Ba	92,8Aa	64,8Aa	18,7Aa	51,3Aa	69,3Aa
Chiripá	65,2Aa	5,5Ab	31,2Bb	98,0Aa	66,1Aa	8,5Ab	35,5Ab	76,5Aa
Eragil	56,2ab	22,5a	35,8ab	57,9a	... ⁽²⁾	...	...	...
O’Henry	51,0b	24,9a	33,3ab	53,1a	...	...	...	...

⁽¹⁾ Valores obtidos pela média das avaliações dos experimentos de cada cultivar.

⁽²⁾ Avaliações não realizadas.

L^* : Luminosidade; a^* : coloração verde/vermelho; b^* : coloração azul/amarelo; Ângulo Hue: $\tan^{-1} (b/a)$, em graus.

Colunas seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Linhas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, dentro dos mesmos parâmetros, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todas as cultivares avaliadas, com exceção da cultivar 'O'Henry', apresentaram firmeza de polpa bastante baixa, indicando que o penetrômetro não encontrou resistência para atravessar os tecidos da polpa (Tabela 5). Nota-se que os valores encontrados sete dias após a instalação dos experimentos são da ordem de 5 a 13 vezes menor que os encontrados no dia da instalação dos mesmos (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios de firmeza da polpa (kgf) e teor de sólidos solúveis (°Brix) em pêssegos das cultivares 'Dourado', 'Chiripá', 'Eragil' e 'O'Henry', zero e sete dias após inoculação dos frutos

Cultivar	Firmeza (kgf)		Sólidos solúveis (°Brix)	
	0	7	0	7
Dourado	0,77Ab ⁽¹⁾	0,13B	8,35Aa	7,59Ab
Chiripá	1,83Ab	0,14B	8,85Aa	9,35Aa
Eragil	1,53b	... ⁽²⁾	9,85a	...
O'Henry	6,52a	...	7,78a	...

⁽¹⁾ Valores obtidos pela média das avaliações dos experimentos de cada cultivar.

⁽²⁾ Avaliações não realizadas.

Colunas seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Linhas seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, dentro dos mesmos parâmetros, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os teores de sólidos solúveis encontrados não diferiram estatisticamente entre as cultivares no primeiro dia de avaliação e entre os dias de avaliação. O amadurecimento dos frutos propiciou menor teor de sólidos solúveis na cultivar 'Dourado' do que na cultivar 'Chiripá' (Tabela 5).

2.3.4.2 Inoculação de frutos individualizados

Frutos das cultivares 'Dourado' e 'Chiripá' inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução nutritiva, independentemente de estarem feridos ou não, desenvolveram sintomas de Podridão Mole em no máximo quatro dias (Figura 6C,D). Os mesmos sintomas também foram observados para o tratamento em que os esporos estavam suspensos em água e foram depositados em frutos feridos (Figura 6B), porém não houve manifestação da doença em frutos intactos inoculados com suspensão de esporos do patógeno em água (Figura 6A).

Figura 6 – Pêssegos da cultivar ‘Dourado’ intactos (A, C) ou feridos (B, D) inoculados com suspensões de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água (A, B) ou solução nutritiva (C, D), quatro dias após a inoculação do patógeno

As incidências de Podridão Mole nos tratamentos em que os frutos das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’ foram infectados com o patógeno foram superiores a 85% (Figura 7). Para a cultivar ‘Dourado’, a incidência de pêssegos sintomáticos no tratamento em que frutos feridos foram inoculados com suspensão de esporos em água foi estatisticamente igual aos tratamentos em que suspensão de esporos em solução nutritiva foram inoculados em frutos feridos ou não, que diferiram estatisticamente entre si (Figura 7A). Já para a cultivar ‘Chiripá’, os tratamentos em que frutos foram feridos e inoculados com suspensão de esporos do patógeno em solução nutritiva ou água apresentaram níveis mais elevados de incidência do que o tratamento em que frutos intactos foram inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva (Figura 7B).

Figura 7 – Incidência, em proporção, de frutos infectados com *Rhizopus stolonifer* em pêssegos das cultivares ‘Dourado’ (A) e ‘Chiripá’ (B) nos diferentes tratamentos utilizados. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Média de dois experimentos

Em contrapartida, não houve incidência de Podridão Mole em frutos intactos e inoculados com suspensão de esporos do patógeno em água (Figuras 6A e 7). Esse fato demonstra que não há infecção por *R. stolonifer* na ausência de substâncias nutritivas, sejam elas artificiais (solução nutritiva preparada) ou provenientes do extravasamento causado quando o fruto é injuriado.

2.3.4.3 Progresso espaço-temporal da Podridão Mole a partir da inoculação de um único fruto

Frutos das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’, feridos ou não, localizados na posição central das bandejas plásticas, quando inoculados com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em solução nutritiva, desenvolveram sintomas de Podridão Mole. O fungo se disseminou para os frutos adjacentes ao pêssego inoculado artificialmente e produziu as mesmas lesões. A disseminação ocorreu de fruto para fruto, com o decorrer dos dias, até que todos os pêssegos da bandeja estivessem infectados pelo patógeno (Figura 8). O processo também ocorreu quando se inoculou esporos de *R. stolonifer* suspensos em solução aquosa em frutos feridos. No entanto, no tratamento em que pêssegos não feridos foram

inoculados com suspensão de esporos em água, não houve penetração do patógeno e, conseqüentemente, não ocorreu desenvolvimento da doença para os demais frutos, portanto o tratamento não entrou nas análises estatísticas. Apenas um dos experimentos com a cultivar ‘Dourado’ foi utilizado para as análises de dados.

Figura 8 – Pêssegos da cultivar ‘Chiripá’ agrupados em bandejas de comercialização. Inoculação do fruto central não ferido (seta) com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em solução nutritiva e disseminação do patógeno para frutos adjacentes com o decorrer dos dias após inoculação: 1° (A), 2° (B), 3° (C), 4° (D), 5° (E), 6° (F), 7° (G), 8° (H), 9° (I) e 10° (J) dia

Para os experimentos em que se utilizou a cultivar ‘O’Henry’, em que o fruto localizado na posição central foi inoculado com *R. stolonifer*, sintomas da doença também foram observados. O patógeno se disseminou para os pêssegos adjacentes

ao fruto inoculado artificialmente e produziu as mesmas lesões. A disseminação ocorreu de fruto para fruto até que todos os pêssegos da prateleira estivessem infectados pelo patógeno (Figura 9).

Figura 9 – Pêssegos da cultivar 'O'Henry' agrupados em prateleiras. Inoculação do fruto central ferido (seta) com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água e disseminação do patógeno para frutos adjacentes com o decorrer dos dias após inoculação: 2° (A), 3° (B), 4° (C), 5° (D), 6° (E), 7° (F), 8° (G), 9° (H), 10° (I), 11° (J), 12° (K), 13° (L), 14° (M), 15° (N), 16° (O), 17° (P) e 18° (Q) dia

O fruto central da primeira coluna dos experimentos com a cultivar ‘Eragil’ ferido e inoculado com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água apresentou sintomas de Podridão Mole dois dias após inoculação com o fungo. Os frutos adjacentes, os quais não foram feridos nem inoculados com o patógeno, também apresentaram os mesmos sintomas, já que *R. stolonifer* foi capaz de se disseminar do fruto inoculado artificialmente para os demais (dados não apresentados).

O progresso da incidência da Podridão Mole em pêssegos foi bem explicado pelo modelo logístico. A boa adequação do modelo aos dados de incidência pode ser verificada pelos elevados coeficientes de determinação (R^2), os quais foram maiores que 0,96 (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros do modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a+b*t)})$ ajustado aos dados de incidência de Podridão Mole em pêssegos das cultivares ‘Dourado’, ‘Chiripá’, ‘Eragil’ e ‘O’Henry’ nos diferentes tratamentos

Tratamento ⁽¹⁾	R^2 ⁽²⁾	b ⁽³⁾ (erro b) ⁽⁴⁾
T ₁	0,99	0,64a (0,04)
T ₃	0,99	0,56a (0,04)
T ₄	0,99	0,65a (0,05)
T ₅	0,98	0,63a (0,04)
T ₇	0,99	0,66a (0,03)
T ₈	0,98	0,75a (0,06)
T ₉	0,98	0,40 (0,02)
T ₁₀	0,96	0,40 (0,03)

(1) Tratamentos correspondentes aos apresentados na Tabela 2.

(2) Coeficiente de determinação obtido pelo modelo $y = 1/(1+\exp^{-(a+b*t)})$.

(3) b refere-se à taxa de progresso da doença, estimada pelo modelo $y = 1/(1+\exp^{-(a+b*t)})$.

(4) Erro obtido para o parâmetro b .

Colunas seguidas da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si pelo teste das “dummies variables”.

Quando se compararam os tratamentos água com fermento e solução nutritiva com fermento e sem fermento, dentro das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’, verificou-se não haver diferença entre as taxas de progresso da doença, ou seja, na variação da incidência com o decorrer do tempo, representado pelo parâmetro b das equações (Tabela 6). Dessa forma, não há diferença estatística entre as curvas de

progresso da incidência para os diferentes tratamentos nas diferentes cultivares (Tabela 6 e Figura 10).

Figura 10 – Curvas de progresso da proporção de pêssegos da cultivar ‘Dourado’ (A) e ‘Chiripá’ (B) com sintomas de Podridão Mole estimadas pelo modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a+bt)})$. Círculos e linhas sólidas correspondem ao tratamento em que frutos foram feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água; quadrados e linhas pontilhadas, a pêssegos feridos e inoculados com suspensão em solução nutritiva; e triângulos e linhas tracejadas, a frutos não feridos e inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva. As curvas foram ajustadas aos dados de um ou dois experimentos das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’, respectivamente

Depois de *R. stolonifer* conseguir penetrar o primeiro fruto, sua dispersão para os demais frutos ocorre a uma mesma taxa de progresso, que variou na cultivar ‘Dourado’ de 0,56 a 0,65 por dia e na cultivar ‘Chiripá’ de 0,63 a 0,75 por dia. Ou seja, a proporção de frutos infectados pelo fungo com o decorrer do tempo é, estatisticamente, a mesma para qualquer um dos tratamentos.

Com essas observações, para os experimentos com as cultivares ‘Eragil’ e ‘O’Henry’, utilizou-se apenas o tratamento em que pêssegos foram feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água. Não havendo diferenças entre os três experimentos, dentro da mesma cultivar, seus dados foram agrupados e analisados, sendo que uma curva de progresso da doença foi ajustada para cada uma das cultivares (Figura 11).

Figura 11 – Curvas de progresso da proporção de pêssegos da cultivar ‘Eragil’ (A) e ‘O’Henry’ (B) com sintomas de Podridão Mole, estimadas pelo modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a+b*t)})$. Círculos, quadrados e triângulos correspondem, respectivamente, aos primeiro, segundo e terceiro experimentos. Curvas foram ajustadas aos dados dos três experimentos

Nesses experimentos, todos os frutos apresentaram sintomas de Podridão Mole no último dia de avaliação. Entretanto, as curvas estão mais bem ajustadas aos pontos até, aproximadamente, o décimo dia de avaliação (Figura 11). Os valores da taxa de progresso da doença para as cultivares ‘Eragil’ e ‘O’Henry’ foram as mesmas: 0,4 por dia e relativamente mais baixas que nas cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’ (Tabela 6), apesar de não terem sido comparadas estatisticamente, devido aos diferentes arranjos experimentais e dias de avaliação.

No caso do modelo ajustado à severidade da doença (y), esta é função da distância x e do tempo t . Caso se considere uma distância fixa, a evolução da disseminação do patógeno dependerá somente do tempo, o que resultará numa curva de progresso da doença. Entretanto, fixando-se o tempo, a severidade será função apenas da distância em relação ao inóculo primário, resultando em uma curva de gradiente. Para este modelo, a severidade da doença aumenta com o tempo, assumindo-se que a curva de progresso da doença é dada por uma função crescente. No entanto, a severidade diminui conforme maior a distância da fonte de inóculo, assumindo-se que o gradiente seja descrito por uma função decrescente.

Os coeficientes de determinação (R^2), obtidos com o modelo logístico que integra tempo e distância, variaram de 0,93 a 0,98 (Tabela 6), demonstrando boa adequação do modelo aos dados de severidade em todos os experimentos.

Tabela 7 – Parâmetros do modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$ ajustado aos dados de severidade de Podridão Mole em pêssegos das cultivares ‘Dourado’, ‘Chiripá’, ‘Eragil’ e ‘O’Henry’ em diferentes arranjos experimentais e tratamentos

Tratamento ⁽¹⁾	R^2 ⁽²⁾	b ⁽³⁾ (erro b) ⁽⁴⁾	c ⁽³⁾ (erro c) ⁽⁴⁾	d ⁽³⁾ (erro d) ⁽⁴⁾
T ₁	0,98	1,22c (0,09)	7,09b (0,49)	0,29a (0,03)
T ₃	0,97	1,87a (0,16)	8,75a (0,77)	0,21b (0,04)
T ₄	0,98	1,57b (0,12)	8,30a (0,66)	0,28a (0,04)
T ₅	0,97	1,36a (0,10)	8,16b (0,62)	0,23b (0,04)
T ₇	0,98	1,33a (0,09)	10,23a (0,65)	0,45a (0,04)
T ₈	0,97	1,34a (0,10)	8,36b (0,64)	0,35ab (0,05)
T ₉	0,93	0,74 (0,04)	6,12 (0,34)	0,23 (0,01)
T ₁₀	0,96	0,94 (0,04)	4,19 (0,19)	0,08 (0,01)

⁽¹⁾ Tratamentos correspondentes aos apresentados na Tabela 2.

⁽²⁾ Coeficiente de determinação obtido pelo modelo $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$.

⁽³⁾ b , c e d referem-se, respectivamente, aos parâmetros correspondentes à distância, à taxa de progresso da doença e à interação entre tempo e espaço/distância estimados pelo modelo $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$.

⁽⁴⁾ Erros obtidos para cada parâmetro estimado pelo modelo $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$.

Colunas seguidas da mesma letra, dentro de cada cultivar, não diferem entre si pelo teste das “dummies variables”.

Para a cultivar ‘Dourado’, a taxa de progresso da doença, representada pelo parâmetro b , foi mais elevada para o tratamento solução nutritiva com fermento (1,87 por dia) que nos demais, evidenciando maior aumento de severidade com o decorrer do tempo. Os valores do parâmetro c dos tratamentos solução nutritiva com fermento (8,75 por fruto) e sem fermento (8,30 por fruto) foram equivalentes entre si e maiores que o valor do tratamento água com fermento (7,09 por fruto) (Tabela 7). No tratamento em que se feriu e se inoculou o pêssego central da cultivar ‘Dourado’ com suspensão de esporos em solução nutritiva (Figura 12C), os valores do parâmetro d foram estatisticamente menores que para os tratamentos água com fermento e solução nutritiva sem fermento e maiores diferenças entre as distâncias das curvas, ou seja, maiores valores do parâmetro d , foram observadas para esses tratamentos (Tabela 7 e Figura 12A, C, E). Isso significa que a variação/aumento de velocidade na propagação do patógeno ficou mais evidente nesses tratamentos com o passar do tempo de avaliação, apesar de essa variação também ter sido significativa para o tratamento solução nutritiva com fermento, devido ao bom ajuste das curvas aos dados.

Quando se compararam os tratamentos água com fermento e solução nutritiva com fermento e sem fermento, dentro da cultivar ‘Chiripá’, verificou-se não

haver diferença entre as taxas de progresso da doença, ou seja, na variação da severidade com o decorrer do tempo, representado pelo parâmetro b das equações. Os valores de b variaram de 1,33 a 1,36 por dia para a cultivar 'Chiripá'. Para o parâmetro c , o tratamento solução nutritiva com fermento apresentou taxas mais elevadas que os demais tratamentos, que foram iguais entre si (Tabela 7 e Figura 12B, D, F). O valor de c para o tratamento solução nutritiva com fermento foi de 10,23 por fruto (Tabela 7). Devido ao parâmetro d estar relacionado à distância e ao tempo, houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, principalmente pelo fato de ter havido diferenças quanto ao parâmetro c , referente à distância em relação à fonte de inóculo. Os valores do parâmetro d dos tratamentos em que se inoculou o pêssogo central, ferido ou não com suspensão de esporos em solução nutritiva, foram estatisticamente iguais entre si e maiores que os valores do tratamento água com fermento (Tabela 7 e Figura 12B, D, F). Isso significa que a variação/aumento de velocidade na propagação do patógeno ficou mais evidente nesses tratamentos com o passar do tempo de avaliação, apesar de essa variação também ter sido significativa para o tratamento água com fermento, devido ao bom ajuste do modelo aos dados. Dessa forma, o maior vigor para dispersão do patógeno no tratamento solução nutritiva com fermento contribuiu para maiores áreas de tecido doente a distâncias maiores do inóculo primário (Tabela 7 e Figura 12B, D, F).

Figura 12 – Curvas de proporção da área de tecidos de pêssegos da cultivar ‘Dourado’ (A, C, E) e ‘Chiripá’ (B, D, F) com sintomas de Podridão Mole, em relação à distância, em frutos, do inóculo primário (fruto central), estimadas pelo modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$. Tratamentos: água com fermento (A, B); solução nutritiva com fermento (C, D) e solução nutritiva sem fermento (E, F). Diferentes curvas e símbolos representam a variação da severidade da doença de acordo com intervalos de tempo de três dias, iniciando-se ao 3º dia e finalizando-se ao 12º dia, para a cultivar ‘Dourado’ e intervalos de tempo de dois dias, iniciando-se ao 2º dia e finalizando-se ao 10º dia, para a cultivar ‘Chiripá’. As curvas foram ajustadas aos dados de um ou dois experimentos das cultivares ‘Dourado’ e ‘Chiripá’, respectivamente

A severidade diminui com o aumento da distância do fruto em relação ao pêssago inoculado artificialmente, em todas as curvas representadas (Figuras 12 e 13). Cada uma dessas curvas refere-se a uma unidade de tempo fixa, em dias, em que há demonstração da evolução da doença, considerando-se apenas o aumento da distância em relação à fonte de inóculo. Com o decorrer do tempo, evidenciado pelas curvas em movimento, também denominadas ondas epidêmicas, a doença atinge frutos mais distantes. Com o último dia de avaliação, a tomada de praticamente todos os frutos do arranjo pelo fungo fica evidenciada pelos valores mais altos de severidade.

Apesar de o intervalo de tempo ser o mesmo para as mesmas cultivares (a cada três dias para a cultivar 'Dourado' e a cada dois dias para a cultivar 'Chiripá'), as curvas não apresentam mesma distância entre si, devido à forma de dispersão do patógeno (Figura 12). Com o decorrer dos dias, a velocidade de propagação da doença aumenta, isto é, em iguais intervalos de tempo, o patógeno alcança maiores distâncias ao final da epidemia do que no seu início, tomando quase que completamente todos os frutos, o que é evidenciado pelos altos valores da severidade.

Para as demais cultivares testadas, 'Eragil' e 'O'Henry', não houve possibilidade de comparação entre os parâmetros dos modelos ajustados aos dados de Podridão Mole das mesmas, devido aos diferentes arranjos experimentais utilizados. Entretanto, não houve diferenças entre experimentos dentro da mesma cultivar e por isso seus dados foram agrupados e analisados (Tabela 7 e Figura 13).

A evolução da severidade da Podridão Mole em frutos das cultivares 'Eragil' (Figura 13A) e 'O'Henry' (Figura 13B) é demonstrada através de curvas que representam o tempo de avaliação em intervalos de três dias, iniciando-se no terceiro e terminando no décimo oitavo.

O modelo logístico com quatro parâmetros ajustou-se adequadamente aos dados dos experimentos com as cultivares 'Eragil' e 'O'Henry', com coeficientes de determinação (R^2) de 0,93 e 0,96, respectivamente (Tabela 7 e Figura 13). O valor da taxa de progresso da doença, representado pelo parâmetro b , nos experimentos com a cultivar 'Eragil' foi de 0,74 por dia (Tabela 7), o mais baixo dentre as cultivares e arranjos avaliados. O valor do parâmetro d dos experimentos com a cultivar 'O'Henry' foi o menor dentre todos os experimentos conduzidos (Tabela 7), demonstrando que, nessa cultivar, não há grande variação de velocidade de

dispersão do patógeno entre o início e fim da epidemia, apesar de o parâmetro ser estatisticamente significativo.

Figura 13 – Curvas de proporção da área de tecidos de pêssegos das cultivares ‘Eragil’ (A) e O’Henry (B) com sintomas de Podridão Mole, em relação à distância, em frutos, do inóculo primário (fruto central), estimadas pelo modelo logístico $y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$. Frutos central da primeira (A) e sexta (B) colunas feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água. Diferentes curvas e símbolos representam a variação da severidade da doença de acordo com intervalos de tempo de três dias, iniciando-se ao 3º dia e finalizando-se ao 18º dia. Curvas foram ajustadas aos dados dos três experimentos de cada cultivar

2.3.5 Efeito de diisopropil fluorofosfato na infecção de pêssegos por *Rhizopus stolonifer*

Avaliações microscópicas da morfologia e germinação de esporos de *Rhizopus stolonifer* submetidos ao tratamento com diisopropil fluorofosfato (DIPF) revelaram que 100% dos esporos germinaram e não apresentaram anormalidades em seu desenvolvimento, assim como no tratamento testemunha. Dessa forma, o inibidor de enzimas parece não afetar o desenvolvimento morfogênico normal dos esporos durante o processo de germinação.

Alguns pêssegos inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* e tratados com solução de DIPF demonstraram sintomas de Podridão Mole, no entanto a incidência de frutos doentes não ultrapassou os 50%, enquanto atingiu

100% em frutos não tratados (Figura 14 e Tabela 8). Frutos que não receberam a suspensão de esporos do patógeno e foram ou não tratados com DIPF não mostraram sintomas da doença (dados não apresentados).

Tabela 8 – Incidência (%) de pêssegos com sintomas de Podridão Mole e submetidos ou não a tratamentos com diisopropil fluorofosfato (DIPF) em diferentes tempos após a inoculação com *Rhizopus stolonifer*

Tempo (horas) para adição de solução de DIPF à suspensão de esporos sobre os frutos	Incidência ⁽¹⁾ (%)
Controle ⁽²⁾	100 A
0	50 AB
1	50 AB
2	10 B
4	30 B
6	30 B

⁽¹⁾ Valores obtidos pela média de dois experimentos.

⁽²⁾ Tratamento ao qual não se adicionou solução de DIPF.

Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O DIPF possui por função inibir a produção de enzimas esterases pelo fungo, principalmente a cutinase. No entanto, devido a sua volatilidade e ao rápido desenvolvimento de *R. stolonifer* sobre frutos, o produto não foi capaz de inibir o processo infeccioso em alguns pêssegos dos tratamentos em que foi aplicado em diferentes períodos após inoculação com o patógeno. Os tratamentos em que se aplicou DIPF duas horas após inoculação com o patógeno diferiram significativamente, em proporção de frutos doentes, do tratamento em que o produto não foi utilizado (Figura 14 e Tabela 8).

Em alguns frutos, observou-se que o produto não foi capaz de impedir a formação de micélio de *R. stolonifer* sobre os frutos (Figura 14A), porém impediu que essas estruturas fossem capazes de produzir cutinase, degradassem a cutina existente na superfície dos frutos, penetrassem os pêssegos e causassem sintomas da Podridão Mole, como os encontrados em frutos não tratados com DIPF (Figura 14B).

Figura 14 – Pêssegos inoculados com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em solução nutritiva e tratados (A) ou não (B) com solução de diisopropil fluorofosfato (DIPF), com concentração de 100 μ M, duas horas após inoculação com o patógeno. Formação de micélio sobre o local de deposição da suspensão de esporos do fungo (setas)

2.3.6 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por *Rhizopus stolonifer* ao microscópio eletrônico de varredura

Em amostras de pêssegos coletadas 8 horas após a inoculação com suspensão de esporos do patógeno em água (Figura 15A, B), nos tratamentos em que os frutos foram feridos (Figura 15A), não se observaram esporos do patógeno, pois, além de a imagem ter sido pouco ampliada, os esporos encontravam-se completamente germinados, com seus tubos germinativos ao redor e no interior do ferimento. Para as amostras com frutos não feridos (Figura 15B), a ampliação da imagem foi dez vezes maior que a Figura 15A, o que permitiu a visualização de esporos não germinados com tamanho aproximado de 10 μ m. Frutos feridos inoculados com suspensão de esporos do fungo em solução nutritiva demonstraram desenvolvimento mais vigoroso das estruturas do patógeno, cujas hifas cresceram sobre a região do ferimento (dados não apresentados).

Figura 15 – Pêssegos com ferimento (setas pontilhadas) (A, C) ou intactos (B, D) e inoculados com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água (A, B) ou solução nutritiva (C, D). Amostras submetidas ao tratamento ao vapor de ósmio 8 (A, B) e 12 (C, D) horas após inoculação com o patógeno. Esporos não germinados do patógeno em água (setas cheias) em frutos intactos e intumescimento de hifa ao final do tubo germinativo de esporos germinados em solução nutritiva e depositados sobre frutos intactos (setas tracejadas). Figuras A e C com amplificação dez vezes menor que as figuras B e D

Em amostras de pêssegos coletadas 12 horas após a inoculação (Figura 15C, D), apenas o tratamento correspondente a frutos não feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água não apresentou germinação de esporos e penetração do fungo (dados não apresentados). No caso do tratamento correspondente a frutos feridos e inoculados com suspensão em solução nutritiva (Figura 15C), houve grande desenvolvimento do patógeno ao redor e no interior do ferimento. Em frutos não feridos e inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva (Figura 15D), observou-se possível penetração de estruturas em frutos intactos, com a produção de uma hifa intumescida ao final do tubo germinativo, em contato com a superfície do pêssego, que pode ser uma estrutura de pré-penetração do patógeno.

Para amostras coletadas 18 horas após a inoculação com *R. stolonifer*, seus esporos não germinaram nem penetraram pêssegos intactos quando em solução

aquosa, enquanto que nos demais tratamentos utilizados houve penetração e grande desenvolvimento do fungo, devido ao maior tempo de incubação. O crescimento de *R. stolonifer* foi muito mais vigoroso em frutos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva, em que as hifas tornaram-se aglomeradas e produziram uma massa compacta (dados não apresentados).

Nos tratamentos testemunha, em que apenas alíquotas de água ou solução nutritiva foram depositadas sobre os frutos, não se observou desenvolvimento do patógeno. Apenas tricomas típicos de superfície dos pêssegos foram observados; essas estruturas são responsáveis pelo aspecto aveludado e pela volatilização de compostos aromáticos (dados não apresentados).

Devido ao fato de a presença dos tricomas ter dificultado a visualização do processo de penetração de frutos por *R. stolonifer*, nectarinas, rosácea de caroço pertencente ao mesmo gênero dos pêssegos, foram utilizadas por apresentarem superfície lisa, isto é, sem presença de tricomas.

Para amostras de nectarinas coletadas 8 horas após inoculação com *R. stolonifer*, foi possível observar a germinação de esporos em todos os tratamentos, exceto em frutos não feridos inoculados com suspensão de esporos em água (Figura 16B). Mesmo com a presença de estômatos na superfície, o patógeno não penetrou o fruto via aberturas naturais (Figura 16B). O desenvolvimento dos tubos germinativos foi menor em nectarinas não feridas inoculadas com suspensão em solução nutritiva (Figura 16D) que em frutos feridos (Figura 16A, C). Esporos de *R. stolonifer* em água inoculados sobre nectarinas feridas (Figura 16A) germinaram e penetraram o fruto não somente pelo ferimento, mas também via superfície intacta, evidência de que a penetração direta do patógeno pode ocorrer. Nesse caso, o ferimento seria útil para liberação de substâncias açucaradas que estimulam a germinação de esporos, já que germinação foi observada em tratamentos em que se utilizou suspensão de esporos em solução nutritiva sobre frutos não feridos (Figura 16D), mas não foi observada em nectarinas nem em pêssegos não feridos inoculados com suspensão de esporos em água (Figuras 15B e 16B). Assim como em pêssegos, em nectarinas feridas e inoculadas com suspensão de esporos em solução nutritiva, houve grande desenvolvimento de hifas do patógeno ao redor e no interior do ferimento (Figura 16C).

Figura 16 – Nectarinas com ferimento (setas pontilhadas) (A, C) ou intactas (B, D) e inoculadas com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água (A, B) ou solução nutritiva (C, D). Amostras submetidas ao tratamento ao vapor de ósmio 8 horas após inoculação com o patógeno. Esporos não germinados em água (setas cheias) e em germinação em solução nutritiva (setas tracejadas) depositados sobre frutos intactos. Figuras A e C com amplificação menor que nas demais figuras

A germinação e a penetração de *R. stolonifer* em frutos submetidos a todos os tratamentos, com exceção de nectarinas não feridas inoculadas com suspensão de esporos em água, também foram observados nas amostras após 12 horas da inoculação com o patógeno. No entanto, o desenvolvimento de estruturas do patógeno foi mais vigoroso, devido ao maior tempo de incubação. Nectarinas feridas e inoculadas com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em água (Figura 17A) mostraram maior porcentagem de germinação de esporos ao redor do ferimento do que em regiões mais distantes, evidência de que os exsudatos do ferimento podem ser responsáveis pela germinação dessas estruturas. Tubos germinativos desenvolveram-se sobre o ferimento em frutos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva (dados não apresentados) e, assim como demonstrado em pêssegos, estruturas intumescidas, possivelmente de pré-penetração, puderam ser observadas ao final dos tubos germinativos de esporos do fungo depositados sobre superfície intacta dos frutos (Figura 17B).

Figura 17 – Nectarinas com ferimento (seta pontilhada) (A) ou intactas (B) e inoculadas com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água (A) e solução nutritiva (B). Amostras submetidas ao tratamento ao vapor de ósmio 12 horas após inoculação com o patógeno. Intumescimento de hifa ao final do tubo germinativo de esporos germinados em solução nutritiva e depositados sobre frutos intactos (setas cheias) e penetração direta de tubos germinativos pela superfície intacta (seta tracejada)

Em amostras de nectarina coletadas 18 horas após inoculação com *R. stolonifer*, também foram observadas as mesmas características das amostras

coletadas após 12 horas. Contudo aquelas apresentaram desenvolvimento mais vigoroso das estruturas do patógeno, dificultando, dessa forma, a visualização do processo de penetração, especialmente nas amostras inoculadas com suspensão de esporos em solução nutritiva (dados não apresentados).

Nos tratamentos testemunha, em que apenas alíquotas de água ou solução nutritiva foram depositadas sobre os frutos (Figura 18), não se observou desenvolvimento de estruturas de *R. stolonifer*. Entretanto, podem ser observadas áreas mais escuras, caracterizadas pelo local de depósito da alíquota de água (Figura 18A, B) ou solução nutritiva (Figuras 18C, D).

Figura 18 – Nectarinas com ferimento (setas) (A, C) ou intactas (B, D) sobre as quais se depositaram água (A, B) ou solução nutritiva (C, D). Amostras submetidas ao tratamento ao vapor de ósmio 8 horas após deposição das alíquotas

Através desses experimentos, observou-se que, tanto em pêssegos quanto em nectarinas não feridas e inoculadas com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução nutritiva, houve germinação de esporos, fato que não ocorreu para a suspensão em água. Entretanto em frutos feridos inoculados com suspensão em água, foi observada germinação e penetração do patógeno.

2.3.7 Análise do processo de infecção de pêssegos e nectarinas por *Rhizopus stolonifer* ao microscópio óptico

Com a observação das imagens produzidas ao microscópio óptico, verificou-se que *Rhizopus stolonifer* é capaz de penetrar frutos de rosáceas de caroço, na ausência de ferimentos, desde que sejam fornecidas substâncias nutritivas aos esporos do fungo, permitindo sua germinação. Uma vez germinados, esses esporos foram capazes de penetrar as barreiras celulares intactas de frutos feridos (Figura 19A) ou não injuriados (Figura 19B), produzindo estrutura intumescida de pré-penetração.

Figura 19 – Cortes de pêssegos (A, B, C) e nectarinas inoculados (A, B) ou não (C, D) com esporos de *Rhizopus stolonifer*. Processo de germinação e penetração de superfícies de frutos intactas (setas): pêssegos feridos e inoculados com suspensão de esporos do fungo em água (A) e pêssegos não feridos inoculados com suspensão de esporos em solução nutritiva (B)

Nas amostras de pêssegos (Figura 19C) e nectarinas (Figura 19D) em que não se inocularam esporos de *R. stolonifer*, o processo infeccioso não foi observado e as estruturas da superfície dos frutos permaneceram intactas.

Pode-se, também, observar externamente à superfície de frutos inoculados, esporos germinados devido a substâncias nutritivas utilizadas no momento da inoculação. Alguns desses esporos foram capazes de penetrar a superfície intacta do fruto e o processo de infecção por *R. stolonifer* é evidenciado pela presença de estruturas do patógeno (hifas) de coloração arroxeadada entre células no interior dos frutos. Além disso, uma camada de células de coloração vermelha, próxima à superfície do fruto, foi formada devido à oxidação de compostos fenólicos presentes nas células (Figura 20). Essa oxidação é decorrente do processo de infecção e colonização do fruto pelo patógeno, que pode ser visualizado macroscopicamente pela presença dos sintomas da Podridão Mole em frutos infectados: áreas circulares marrons e aquosas, que liberam substâncias de odor ácido ou fermentado.

Figura 20 – Pêssego não ferido e inoculado com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* (seta cheia) em solução nutritiva. Processo infeccioso desencadeado pelo patógeno: presença de estruturas do patógeno entre células no interior dos frutos (setas tracejadas) e camada de células de coloração vermelha formada devido à oxidação de compostos fenólicos

2.4 Discussão

Neste trabalho, demonstrou-se que *R. stolonifer* foi capaz de penetrar diretamente pêssegos na ausência de ferimentos pela germinação de seus esporos em solução nutritiva depositada sobre os frutos e através de estolões, que, oriundos da estrutura vegetativa do patógeno presente em frutos doentes, atingem frutos sadios. Esporos de *R. stolonifer* suspensos em água não foram capazes de penetrar frutos de rosáceas de caroço que não apresentavam injúrias (Figuras 6A, 15B e

16B). A incapacidade de germinação de esporos de *Rhizopus* na ausência de um aporte nutritivo externo ao fruto já foi reportada (NGUYEN-THE et al, 1989). O patógeno necessita de uma fonte externa de carbono e nitrogênio para que seus esporos germinem, visto que estes contêm quantidades insuficientes de carbono endógeno para que a germinação ocorra em água destilada (MEDWID; GRANT, 1984). O fungo necessita de algumas horas em solução rica em nutrientes para germinar (HARTER; WEIMER, 1922) e produzir hifas infectivas (SRIVASTAVA; WALKER, 1959). Davis (1991) reportou que durante a colheita de framboesas, o receptáculo do fruto é removido e a cavidade resultante exsuda substâncias que propiciam ambiente favorável de umidade e fornecimento de nutrientes ao desenvolvimento de *Rhizopus*. Ferimentos em pedúnculo de bagas e conexão incompleta entre baga e pedicelo também propiciam a infecção de uvas pelo patógeno através de tecido intacto maduro devido ao extravasamento de substâncias celulares (LISKER et al., 1996; TAVARES; SILVA, 2006). Também já foi relatado que, uma vez estabelecido em um pêssago, *Rhizopus* consegue invadir frutos adjacentes, através de seus estolões, e causar a chamada infecção em ninho (SNOWDON, 1990). No entanto, nenhum dos trabalhos anteriores demonstrou a infecção direta do patógeno em seus hospedeiros.

Neste estudo, observou-se que independente do tempo de incubação, suspensões de esporos de *R. stolonifer* em solução de indoxil acetato coloriram-se de azul, resultado da formação de cristais de cor azul índigo devido à reação de enzimas da família das serina-esterases com o substrato. A formação de cristais no interior e ao redor de esporos também foi observada para *Colletotrichum graminicola*, patógeno do milho e do sorgo (PASCHOLATI et al., 1993), e *Uromyces viciae-fabae*, patógeno do feijão (DEISING et al., 1992). Esses microrganismos são conhecidos pela produção de enzimas esterases, mais especificamente a cutinase, que auxiliam na fixação do microrganismo à cutícula do hospedeiro e na penetração direta de suas superfícies. Quanto maior foi o tempo de incubação das suspensões de esporos de *R. stolonifer*, mais escuro era o tom de azul das suspensões, isso porque períodos maiores possibilitam maiores taxas de germinação de esporos que, provavelmente, influenciam na maior produção de enzimas esterases. Os tons mais escuros de azul nos maiores tempos de incubação foram observados, principalmente, em suspensões de esporos em solução nutritiva, a qual contribui para a germinação de esporos do fungo. Quando germinados, esses esporos são

capazes de produzir maiores quantidades de enzimas esterases, que auxiliam no processo de penetração direta dos hospedeiros, degradando a parede de frutos. O fato de esporos de *R. stolonifer* em água não conseguirem penetrar diretamente seus hospedeiros pode ser explicada devido à ausência de germinação e, portanto, à não produção de quantidades suficientes de enzimas que auxiliem no processo, que é evidenciada pelas tonalidades mais claras de azul e menor formação de cristais quando essas suspensões reagem com o substrato indoxil acetato. Essas observações indicam que *R. stolonifer* possui enzimas esterases constitutivas, ou seja, que fazem parte de seus esporos, apesar de não serem encontradas em quantidade suficientes para permitir a penetração pelo patógeno.

Diferentes compostos já foram identificados em esporos de *R. stolonifer*, entre eles glucana, quitosana, melanina e proteínas (DIAZ-TORRES et al., 1988). Durante sua germinação, os esporos sintetizam uma série de tipos de aminoácidos e proteínas (VAN ETEN et al., 1969), entre elas algumas enzimas. *Rhizopus*, considerado um fungo saprófita e polífago, ataca seus hospedeiros com enzimas do complexo das pectinases como a poligalacturonase e a pectina metil esterase, enzimas que maceram o tecido hospedeiro após o processo de infecção e durante a colonização (SPALDING, 1963; SRIVASTAVA et al., 1959; WELLS, 1968). Esporos em germinação do patógeno são capazes de excretar essas enzimas maceradoras de tecido e mesmo com o processo germinativo inibido e incapacidade da produção de novas colônias, enzimas pectolíticas extremamente ativas ainda são produzidas (SOMMER et al., 1963). Segundo esses autores, essas seriam as únicas enzimas produzidas por *R. stolonifer* e são responsáveis tanto pelo processo de infecção quanto de colonização. No entanto, resultados desse estudo comprovam que o patógeno produz outros tipos de enzimas ligadas ao processo infeccioso, como as esterases, por exemplo.

Soluções de substrato indoxil acetato, em que se acrescentam discos de micélio do fungo, adquiriram coloração azul mais escura que nos demais tratamentos em que se usou esporos de *R. stolonifer*, o que sugere que as estruturas vegetativas do microrganismo são capazes de produzir quantidades maiores de enzimas esterases e por isso conseguem penetrar, diretamente através de estolões, frutos sadios e intactos. Essa maior produção de enzimas pelas estruturas vegetativas já foi verificada em tomates inoculados com suspensão de esporos e micélio de *R. stolonifer*. Verificou-se que ambos os métodos causaram

100% de infecção nos frutos, contudo o micélio constituiu forma mais infectiva que as suspensões de esporos, pois produziu maior quantidade de enzimas pectolíticas responsáveis pela maceração celular (VELÁZQUEZ-DEL VALLE et al. 2005).

R. stolonifer, cultivado em meio de cultura contendo cutina como fonte de carbono, cresceu e produziu enzimas esterases, cuja atividade foi comprovada em análises ao espectrofotômetro. O mesmo foi observado para *Pestalotia malicola*, cujos ensaios revelaram atividade abundante da produção dessas enzimas quando o fungo também foi cultivado em meio em que a cutina era a única fonte de carbono (SUGUI et al., 1998). A atividade de enzimas foi quatro vezes maior quando *R. stolonifer* foi cultivado em meio com cutina do que com glicose. Essas observações sugerem que, para crescer e se desenvolver em meio em que a cutina foi a única fonte de carbono, *R. stolonifer* necessitou produzir enzimas esterases específicas do tipo cutinase para ser capaz de degradar a cutina e assimilar o carbono a ser utilizado em seu metabolismo. Esse fato já foi observado para *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, patógeno da ervilha, cuja atividade de cutinase correspondeu a 99,7% da atividade de esterases quando o microrganismo foi cultivado em meio contendo cutina como única fonte de carbono. Quando mutantes desse fungo, sem gene da cutinase, foram testados ao espectrofotômetro, em reação com p-nitrofenil butirato, não foi detectada a presença de esterases e quando esses isolados foram cultivados em meio de cultura com cutina, seu crescimento foi fortemente inibido (STAHL; SCHÄFER, 1992). Apesar de Nguyen-The e Chamel (1991) afirmarem que a degradação de cutícula não está envolvida no processo infeccioso e que a penetração de *R. stolonifer* em superfícies de nectarinas não envolve enzimas cutinolíticas, se *R. stolonifer* não produzisse cutinase, não seria capaz de se desenvolver em meio com cutina nem seria detectada atividade de enzimas esterases em análises ao espectrofotômetro.

A presença de enzima cutinase é essencial para a penetração da camada cuticular de plantas hospedeiras por fungos fitopatogênicos, por isso a importância dessa enzima para a patogenicidade desses fungos (ETTINGER et al., 1987). Evidência que suporta essa hipótese inclui estudos com *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose no mamoeiro. Mutantes do patógeno deficientes na produção de cutinase perderam a patogenicidade e a habilidade de causar doenças em frutos (DICKMAN; PATIL, 1986). Há, também, relatos de que a inserção de genes produtores de cutinase em *Mycosphaerella* spp, patógeno que

conhecidamente penetra frutos de mamão exclusivamente via ferimento, habilita-o a infectar diretamente frutos não injuriados (DICKMAN et al., 1989). Outros relatos demonstram ainda que o uso de inibidores gerais de enzimas da família das serina-esterases, como o diisopropil fluorofosfato (DIPF), previnem o desenvolvimento de doenças em folhas de milho inoculadas com *Colletotrichum graminicola* (PASCHOLATI et al., 1993). Assim também foi observado nesse estudo, em que o mesmo inibidor de enzimas foi utilizado e impediu o desenvolvimento da infecção de pêssegos por *R. stolonifer*. Apesar de o produto não ter inibido a formação de micélio do patógeno, que se desenvolveu a partir da germinação de esporos depositados sobre o fruto, foi capaz de impedir que esse micélio infectasse os pêssegos intactos, provavelmente pela inibição da produção de enzimas cutinases por essa estrutura. A inibição de outras enzimas da família das esterases, além da cutinase, pode, também, ter sido responsável pela redução da patogenicidade do fungo e consequente desenvolvimento da doença (STAHL; SCHÄFER, 1992). Entretanto, devido à rápida germinação de esporos do fungo, os tratamentos em que DIPF foi aplicado mais tardiamente não foram eficientes em inibir a penetração, visto que as enzimas já haviam sido produzidas. E quando o produto foi aplicado logo em seguida à deposição da suspensão de esporos sobre os frutos, por ter características de volatilidade, o produto não se encontrava mais em suspensão no momento da germinação e produção de enzimas pelo patógeno e, por isso, não foi capaz de prevenir a infecção dos frutos.

A adição de suco de pêssogo em suspensão de esporos de *R. stolonifer* depositada sobre nectarinas estimulou o crescimento do fungo e levou à infecção do fruto (NGUYEN-THE et al., 1989). Observou-se que micro fissuras cuticulares tornaram-se mais alargadas e que no interior das mesmas, o fungo conseguiu se desenvolver e produzir enzimas pectinolíticas que hidrolisassem a parede celular dos frutos (NGUYEN-THE et al., 1989). Esse fato não foi observado neste trabalho durante análises ao microscópio eletrônico de varredura e microscópio óptico, em que *R. stolonifer* foi capaz de germinar na presença de solução nutritiva ou exsudatos liberados pelo ferimento e penetrar diretamente as superfícies intactas de pêssegos e nectarinas (Figuras 17 e 19) sem a presença de micro fissuras. Dessa forma, pode-se afirmar que os ferimentos são mais importantes como promotores do extravasamento de suco do que propriamente como porta de entrada do patógeno. As substâncias extravasadas pelo ferimento propiciam a germinação de *R. stolonifer*

com posterior produção de enzimas capazes de degradar a superfícies dos frutos. Assim como observado em superfícies de uvas inoculadas com *R. stolonifer*, esporos do fungo germinaram próximo ao ferimento causado em pêssegos e nectarinas e se desenvolveram vigorosamente ao redor e no interior do mesmo. Da mesma forma, penetração do patógeno não foi observada em rupturas e aberturas naturais da superfície como, por exemplo, estômatos (LISKER et al., 1996). Em visualizações ao microscópio eletrônico de varredura, assim como para *R. stolonifer* em pêssegos, a penetração de *Pestalotia malicola* em frutos de marmelo e ameixas ocorreu pela entrada direta de tubos germinativos na cutícula e seu desenvolvimento se deu sobre a superfície da cutícula e abaixo dela (SUGUI et al., 1998).

Nesse estudo, observou-se que independentemente do tratamento testado para promoção da infecção primária de pêssegos por *R. stolonifer*, em frutos injuriados ou intactos, o patógeno foi capaz de penetrar frutos sadios que estavam próximos a frutos doentes pela emissão de estolões. A proporção de frutos infectados pelo fungo com o decorrer do tempo é, estatisticamente, a mesma para qualquer um dos tratamentos testados, visto que estes possuem taxas de progresso semelhantes (Tabela 6). No caso das análises da severidade de Podridão Mole em pêssegos, houve diferenças estatísticas entre as taxas de progresso da doença e o coeficiente referente às distâncias de dispersão nos diferentes tratamentos (Tabela 7). As maiores taxas foram obtidas quando os frutos foram feridos e inoculados com suspensão de esporos de *R. stolonifer* em solução nutritiva. Esse fato pode ser explicado devido a maior quantidade de substâncias nutritivas disponíveis para o desenvolvimento de *R. stolonifer* que, além de ser encontrado sobre o exsudado do próprio pêssego, causado pelo ferimento, conta com o aporte nutritivo da solução rica em açúcares, facilitando maior cobertura dos frutos pelo patógeno em menor tempo ou a maiores distâncias em relação ao inóculo primário. Nesse tratamento, a uma mesma distância, valores mais altos de severidade são atingidos em menor intervalo de tempo que nos demais tratamentos. Além disso, o fungo consegue atingir maior área de superfície de frutos mais distantes, em um mesmo período de tempo que nos demais tratamentos (Tabela 7). Dessa forma, *R. stolonifer* em todos os tratamentos, possui iguais chances de infectar frutos sadios, mas a porcentagem de área de tecido do fruto coberta pelo patógeno pode variar entre os tratamentos.

O bom ajuste do modelo logístico de quatro parâmetros ($y = 1/(1+\exp^{-(a-c*x+b*t+d*x*t)})$) aos dados de severidade de todos os experimentos demonstra que a

velocidade de disseminação de *R. stolonifer* pelos frutos não é constante, e sim que a propagação da doença muda no espaço e no tempo, sendo mais rápida ao final do experimento, quando o patógeno infecta todos os frutos. Apesar da dispersão do patógeno ter sido mais lenta no arranjo experimental utilizado para a cultivar 'Eragil', visto que o mesmo não permitiu que o fungo se disseminasse em todas as direções (360°) como ocorrido nos demais arranjos, a velocidade de disseminação ainda é crescente. A maior velocidade de dispersão do patógeno ao final do experimento pode ser explicada pela maior facilidade em infectar frutos devido ao amadurecimento dos mesmos, evidenciado pela modificação da coloração da casca, com tons mais amarelos, e menores valores de firmeza da polpa. Com a diminuição da firmeza da polpa, os frutos se tornam mais amaciados ou amolecidos, devido ao decréscimo no turgor das células, resultante do relaxamento proveniente da quebra de ligações ou associações químicas (JACKMAN; STANLEY, 1995). Isso contribui para que se tornem mais suscetíveis à infecção por patógenos, já que as barreiras a serem vencidas por estes são menores. Em maçãs 'Fuji', quanto menor os valores de firmeza da polpa, maior a incidência de podridões, demonstrando que maiores são as chances de penetração de agentes fitopatogênicos em frutos quando estes se tornam mais amolecidos (BRACKMANN et al., 2010). Além da coloração e do amolecimento de frutos, teores de sólidos solúveis, principalmente açúcares, também influenciam na capacidade de infecção de frutos por patógenos. Registrou-se em uvas diminuição da acidez e aumento no teor de sólidos solúveis durante o crescimento e amadurecimento das bagas, acompanhados por aumento na suscetibilidade à infecção por *R. stolonifer* (LISKER et al., 1996). Assim, com o final do experimento, pêssegos mais maduros apresentam maior disponibilidade de substâncias açucaradas e facilitam o processo de infecção e colonização pelo fungo, contribuindo para a maior velocidade de dispersão do patógeno.

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que *Rhizopus stolonifer* é capaz de penetrar diretamente superfície de pêssegos intactas através de estolões miceliais e esporos germinados em aporte nutritivo externo ao fruto. As enzimas da família das esterases, principalmente as cutinases, são produzidas pelo micélio do fungo e pelos tubos germinativos, após a germinação dos esporos. *R. stolonifer* é capaz de degradar cutina mesmo sendo a única fonte de carbono disponível e a penetração do patógeno em frutos sadios é inibida quando se utiliza produto inibidor de esterases.

Os dados do progresso espaço-temporal da Podridão Mole em pêssegos demonstraram que o patógeno é capaz de penetrar frutos sadios e não injuriados que estejam próximos a frutos inicialmente doentes e a taxa de sua dispersão independe de como ocorreu a primeira infecção, com frutos intactos ou injuriados. A velocidade de disseminação de *R. stolonifer* em pêssegos é crescente e a propagação da doença muda no espaço e no tempo sendo mais rápida ao final do experimento, devido ao amadurecimento dos frutos e maior suscetibilidade à infecção.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.M.; LOURENÇO, S.A.; BASSETTO, 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, jan./fev. 2008.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.17, p. 3389-3402, Sept. 1997.
- AMIRI, A.; CHAI, W.; SCHNABEL, G. Effect of nutrient status, pH, temperature and water potential on germination and growth of *Rhizopus stolonifer* and *Gilbertella persicaria*. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 93, n. 3, p. 603-612, 2011.
- AMORIM, L.; MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; ABREU, F.A.; GONÇALVES, F.P. Stone fruit injuries and damage at the wholesale market of São Paulo, Brazil. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 353-357, Mar. 2008.
- 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.
- BRACKMANN, A.; SCHORR, M.R.W.; PINTO, J.A.V.; VENTURINI, T.L. Aplicações pré-colheita de cálcio na qualidade pós-colheita de maçãs 'Fuji'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1435-1438, jun. 2010.
- BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n.1/2, p. 248-254, May 1976.
- COHEN, J.A.; OOSTERBAAN, R.A.; BERENDS, F. Organophosphorus compounds. **Methods in Enzymology**, New York, v. 11(único), p. 686-702, 1967.

DAVIS, R.P. Postharvest soft rot (Leak Disease). In: ELLIS, M.A.; CONVERSE, R.H.; WILLIAMS, R.N.; WILLIAMSON, B. (Ed.) **Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects**. Saint Paul: APS Press, 1991. p. 23-24.

DEISING, H.; NICHOLSON, R.L.; HAUG, M.; HOWARD, R.J.; MENDGEN, K. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n.9, p. 1101-1111, Sept. 1992.

DIAZ-TORRES, M.R.; CLAVERIE-MARTIN, F.; GEOGHEGAN, M.J. Composition and ultrastructure of the sporangiospore wall of *Rhizopus stolonifer*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 34, n. 2, p. 180-186, Feb. 1988.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 28, n. 2, p. 235-242, Mar. 1986.

DICKMAN, M.B.; PODILA, G.K.; KOLATTUKUDY, P.E. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. **Nature**, London, v. 342, n. 6248, p. 446-448, Nov. 1989.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v.19, n.1, p.11-15, 1987.

ETTINGER, W.F.; THUKRAL, S.K.; KOLATTUKUDY, P.E. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. **Biochemistry**, Easton, v. 26, n.24, p. 7883-7892, Dec. 1987.

FISHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: Fundamentos e diagnósticos**. Tradução de FIORAVANTI, I. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 337p.

GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C.; SILVA JUNIOR, G.J.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Postharvest control of brown rot and *Rhizopus* rot in plums and nectarines using carnauba wax. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, n.3, p. 211-217, Dec. 2008.

GUTIERREZ, A.S.D. **Danos mecânicos pós-colheita em pêssego fresco**. 2005. 123p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

HARTER, L.L.; WEIMER, J.L. Decay of various vegetables and fruits by different species of *Rhizopus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 12, n. 5, p. 205-212, Apr. 1922.

JACKMAN R.L.; STANLEY D.W. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. **Trends in Food Science Technology**, Cambridge, v. 6, n. 6, p. 187–194, June 1995.

KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C.; BILHALVA, A.B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. 2. ed. Piracicaba: Livraria e Editora Rural, 2002. 214p.

KOLATTUKUDY, P.E. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. **Science**, Washington, v. 208, n. 4447, p. 990-1000, May 1980.

LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 464p.

LIMA, L.M. **Valoração de atributos de qualidade no preço de pêssegos do Estado de São Paulo**. 2008. 159p. Tese (Doutorado em Economia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LIMA, L.M.; CAIXETA-FILHO, J.V.; KASSOUF, A.L.; AMORIM, L. Valoração de atributos de qualidade em pêssegos comercializados no Estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 47, n. 2, p. 465-484, abr./jun. 2009.

LISKER, N.; KEREN-SHACHAM, Z.; SARIG, P.; ZHTKHI, Y.; BEN-ARIE, R. The biology and pathology of the fungus *Rhizopus stolonifer*, cause of black mould disease of table grapes in Israel. **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n.6, p.1099-1109, Dec. 1996.

MAAS, J.L. *Rhizopus Rot*. In: _____. **Compendium of strawberry diseases**. 2nd. ed. Saint Paul: APS Press, 1998. p. 41.

MADDEN, V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. Saint Paul: APS Press, 2007. 421p.

MARTIM, N.S.P.P. **Estudo das características de processamento da manga (*Mangifera indica* L.) variedade Tommy Atkins desidratada**. 2006. 76p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTINS, M.C.; LOURENÇO, S.A.; GUTIERREZ, A.S.D.; JACOMINO, A.P.; AMORIM, L.; Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.1, p. 5 -10, jan./fev. 2006.

MASSOLA JUNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos Fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 8, p. 149-206.

MEDWID, R.D; GRANT, D.W. Germination of *Rhizopus oligosporus* Sporangiospores. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 6, p. 1067-1071, Dec. 1984.

NERI, F.; MARI, M.; BRIGATI, S.; BERTOLINI, P. Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 1, p.30-35, Jan. 2007.

NGUYEN-THE, C.; CHAMEL, A. Enzymatic degradation of isolated plant cuticles and nectarine fruit epidermis by culture filtrates of phytopathogenic fungi. **Agronomie**, Paris, v. 11, n. 2, p. 101-108, 1991.

NGUYEN-THE, C. HUGUENEY, R.; ARNOUX, M. Contribution à l'étude des voies de pénétration de parasites fongiques des nectarines *Monilinia laxa* (Ascomycète-Discomycète) et *Rhizopus stolonifer* (Zigomycète-Mucorale). **Agronomie**, Paris, v. 9, n. 3, p. 271-276, 1989.

OGAWA, J.M. *Rhizopus Rot*. In: OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UEYMOTO, J.K. (Ed.) **Compendium of Stone Fruit Diseases**. Saint Paul: APS Press, 1995. p. 16.

OGAWA, J.M.; ENGLISH, H. Stone fruit and their diseases. In: _____ **Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops**. Oakland: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1991. chap. 3, p. 125-242.

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, n. 1, p. 37-51, Jan. 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SNOWDON A.L. **A Colour Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruit and Vegetables**: General Introduction and Fruits. London: Wolfe Scientific, 1990. 370p.

SOMMER, N.F.; CREASY, M.T.; MAXIE, E.C.; ROMANI, R.J. Production of pectolytic enzymes by *Rhizopus stolonifer* sporangiospores after "lethal" gamma irradiation. **Applied Microbiology**, Washington, v. 11, n. 6, p. 463-466, Nov. 1963.

SOUZA, A.L.B.; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B.; MACHADO, J.da C. Resistência pós-colheita do pêssogo (*Prunus persica* cv. Biuti) a *Monilinia fructicola*: Indução de respostas bioquímicas pela aplicação do CaCl₂ no local da injúria. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.864-874, out./dez. 1999.

SPALDING, D.H. Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Rhizopus stolonifer*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, n. 12, p. 929-931, Aug. 1963.

SRIVASTAVA, D.N.; WALKER, J.C. Mechanisms of infection of sweet potato roots by *Rhizopus stolonifer*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 49, n. 7, p. 400-406, July 1959.

SRIVASTAVA, D.N.; ECHANDI, E.; WALKER, J.C. Pectolytic and cellulytic enzymes produced by *Rhizopus stolonifer*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 49, n. 3, p. 145-148, Mar. 1959.

STAHL, D.J; SCHÄFER, W. Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 6, p.621-629, June 1992.

SUGUI, J.A.; PASCHOLATI, S.F.; KUNOH, H.; HOWARD, R.J.; NICHOLSON, R.L. Association of *Pestalotia malicola* with the plant cuticle: visualization of the pathogen and detection of cutinase and non-specific esterase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 52, n. 4, p. 213-221, Apr. 1998.

TAVARES, S.C.C.H.; SILVA, I.L.S.S. Doenças da Uva. In: OLIVEIRA, S.M.A.; TERAPO, D.; DANTAS, S.A.F.; TAVARES, S.C.C.H (Ed.). **Patologia pós-colheita: Frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2006. cap. 31, p. 821-885.

VAN ETEN, J.L.; KOSKI R.K.; EL-OLEMY M.M. Protein synthesis during fungal spore germination. IV. Transfer ribonucleic acid from germinated and ungerminated spores. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 100, n. 3, p. 1182-1186, Dec. 1969.

VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; RODRÍGUEZ-AMBRÍZ, S.L. Determinación de la actividad poligalacturonasa en el proceso de maceración causado por *Rhizopus stolonifer* en jitomate. In: CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGÍA, 32.,:CONGRESO INTERNACIONAL DE FITOPATOLOGÍA, 7., 2005, Chihuahua. **Memórias...** Chihuahua: Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., 2005. Resumo L-33.

WALKER, J.C. **Plant Pathology**, 3rd. ed. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing, 1972. 768p.

WELLS, J.M. Growth of *Rhizopus stolonifer* in low-oxygen atmospheres and production of pectic and cellulolytic enzymes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 58, n. 12, p.1598-1602, Dec. 1968.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J.; WITHE, T.J. (Ed.) **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. chap. 38, p.315-322.

ZHANG, Y.; HU, X.S.; CHEN, F. Stability and color characteristics of PEF-triated cyaniding-3-gliciside during storage. **Food Chemistry**, London, v.106, n. 2, p. 669-679, Jan. 2008.