Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva ´Itália´ e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer*

Rafaela Carolina Constantino Roma

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

Rafaela Carolina Constantino Roma
Engenheira agrônoma

Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' e mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer*

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

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

Roma, Rafaela Carolina Constantino
Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva ´Itália´ e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer* / Rafaela Carolina Constantino Roma. - - Piracicaba, 2013.
117 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Ação fungitóxica 2. Controle alternativo 3. Sal inorgânico 4. *Vitis vinífera* I. Título

CDD 634.8
R756f

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

Aos meus pais, Ana e Onivaldo,
e aos meus irmãos,
Pedro, Adriana e André,
por todo amor e incentivo.

Ao meu noivo, Eduardo,
pelo carinho,
companheirismo e
presença constante em qualquer lugar do mundo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sérgio Florentino Pascholati, por ter me acolhido e aberto suas portas e oportunidades.

À pesquisadora Eliane Benato, pelo apoio e pela experiência em pós-colheita repassada.

Ao Dr. Ronaldo Dalio, por ter “lançado a semente” para o desenvolvimento deste trabalho e também por todo apoio e amizade que você e sua esposa, Jaqueline, me proporcionaram desde à convivência na Alemanha.

Ao Olinto Liparini, por ter despertado em mim a paixão pela Fitopatologia.

Ao Prof. Francisco Tanaka, pela amizade e pelo apoio no preparo e análise das amostras em microscopia eletrônica.

Ao estagiário Caio Beraquet, pela amizade e por seu apoio que, sem o qual, eu não teria condições físicas e logísticas para desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica: Sílvia Blumer, Dalilla, Simone, Thiago, Rafael, Nívea, Cynthia, Kaira, Dayson e Sara. Obrigada pelo apoio no decorrer dos experimentos, pelas discussões em Fitopatologia e pela amizade.

Ao Prof. Ivan Paulo Bedendo por ter me aceitado em seu laboratório, inicialmente, e por todo o conhecimento adquirido.

Aos colegas do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos: Bárbara, Thays, Daniela, Evandro, Patrícia e Pedro. Agradeço pelos conhecimentos transferidos em Biologia Molecular.

À Embrapa Uva e Vinho, em especial, ao pesquisador Marcos Botton por ter me recebido na unidade para coleta de amostras para o desenvolvimento do trabalho com fitoplasmas.

Ao Laboratório de Micologia da Embrapa Uva e Vinho, pelo fornecimento do isolado de *Colletotrichum* utilizado em trabalhos posteriores.

Ao Edinilson, da Casa da Uva (CEASA Campinas), pelo apoio e disponibilidade no fornecimento das caixas das uvas.

À Stoller do Brasil, pelo fornecimento do Phytogard® como fonte de fosfito de potássio.

Ao Prof. Angelo Jacomino por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas e ao técnico Marcos Trevisan e a estudante Rebeca de Arruda pelo apoio nas análises.

À Prof. Lilian Amorim pelas sugestões quanto às análises dos dados de pós-colheita.

Ao Prof. Hilton Thadeu, do Departamento de Ciências Florestais, pelas sugestões quanto à instalação dos experimentos e análises estatísticas.

À secretária Fabiana Wolak pela amizade e por todos os esforços em ajudar.

À Dra. Liliane Teixeira, da Clínica de Doenças de Plantas, pelo fornecimento de alguns isolados fúngicos para realização de testes preliminares.

Aos demais técnicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Jeferson, Fernanda, Rodolfo, Maria Heloisa, Edivaldo, Pedro, e aos que trabalharam diretamente comigo, Sílvia Lourenço e Renato Salaroli, pelo apoio durante o período do doutorado.

À técnica Renata Cruz, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pelo uso do microscópio invertido para avaliação dos experimentos de germinação de esporos.

Ao Tiago Tezzoto, do Laboratório de Produção Vegetal (ESALQ/USP), pela auxílio na liofilização das amostras.

Aos colegas do Departamento, em especial, ao Wagner, Ananias, Juliana Ramiro, Juliana Baggio e Antônio, pela ajuda em análises, solução de dúvidas e amizade.

Ao Prof. Wolfgang Oβwald e demais membros da Universidade Técnica de Munique, Freising, Alemanha, pela oportunidade.

Aos colegas de casa na Alemanha: Mario, Ximena, em especial Nuray e a pequena Deniz, e a Jule Vassileva pela companhia durante o período germânico.

Aos euro-brasileiros Nathalia Thais, Guilherme, Wagner e Faviane pela amizade de sempre e apoio durante o período no exterior.

À fisioterapeuta Fernanda Beltrame por colaborar com a melhoria da minha qualidade de vida e pela amizade.

Aos amigos de Viçosa: Faviane, Flávia e família, Gabriel e Marisa, Cíntia, Marina, Juliana Paes, Elaine, Maristela, Carine, Larissa e Fumiko pela duradoura amizade.

À sempre presente Ana Paula, pela amizade, companhia, longas conversas, e ao Tiago, pela grande amizade.

À Ana Paula e à peruana Maria Isabel pela amizade e companhia no doce lar.

À Universidade Federal de Viçosa pela valiosa contribuição em minha formação como Engenheira Agrônoma e como fitopatologista.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos de doutorado.

À CAPES e ao DAAD pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduiche.

À ESALQ/USP e ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela oportunidade.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Onivaldo, e meus irmãos, Pedro, Adriana e André por sempre me mostrarem que tudo vai ficar bem. Obrigada, obrigada, obrigada!

À minha avó Clarinda e à toda minha família pelo apoio.

Ao meu avô Agostinho, que está sempre presente em meu coração.

Ao meu noivo, Eduardo, que é o meu suporte.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Deus, pelo dom da vida, por Sua providência e pela graça da fortaleza, para que eu sempre pudesse seguir em frente e concluir esta importante etapa.

Muito obrigada!

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

"Mas é preciso ter manha

É preciso ter graça

É preciso ter sonho sempre

Quem traz na pele essa marca

Possui a estranha mania

De ter fé na vida...."

Maria Maria – Milton Nascimento

"Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO....13
ABSTRACT....15
1 INTRODUÇÃO GERAL....17
REFERÊNCIAS....18
2 FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM BAGAS UVA 'ITÁLIA'....23
Resumo....23
Abstract....23
2.1 Introdução....24
2.2 Revisão bibliográfica....25
2.2.1 Doenças pós-colheita em uvas....25
2.2.2 Manejo de doenças pós-colheita em uva....28
2.2.3 Uso de fosfito no controle de doenças pós-colheita....29
2.3 Material e métodos....30
2.4 Resultados....39
2.5 Discussão....62
2.6 Conclusões....67
Referências....67
3 MECANISMOS DE AÇÃO DO FOSFITO DE POTÁSSIO À *Rhizopus stolonifer*....79
Resumo....79
Abstract....79
3.1 Introdução....80
3.2 Revisão bibliográfica....81
3.2.1 *Rhizopus stolonifer*: classificação e morfologia....81
3.2.2 Fosfito de potássio: aspectos gerais e aplicações....82
3.2.3 Mecanismos de ação do fosfito de potássio em microrganismos....83
3.3 Material e métodos....84
3.4 Resultados....92
3.5 Discussão....101
3.6 Conclusões....105
Referências....105

APÊNDICES 113

RESUMO

Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva ´Itália´ e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer*

A ocorrência de doenças em uvas de mesa gera perdas desde o cultivo até a comercialização, o que afeta diretamente o potencial de exportação do Brasil. A prevenção na realização de injúrias nos frutos é essencial para garantir a eficácia dos tratamentos aplicados tanto em pré- quanto em pós-colheita. Visando o emprego de produtos alternativos que auxiliem no manejo sustentável da cultura, o fosfito de potássio encontra-se como ferramenta útil. O efeito do fosfito no controle de doenças causadas por oomicetos já foi relatado, porém, como este ingrediente ativo atua sobre microrganismos do reino Fungi ainda é desconhecido. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o fosfito de potássio no controle das doenças podridão mole, mofo cinzento e podridão da uva madura, causadas por *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, respectivamente, em bagas de uva ´Itália´ e seus efeitos na qualidade físico-química dos frutos. Também objetivou-se estudar os mecanismos de ação envolvidos na inibição do desenvolvimento do micélio de *R. stolonifer* na presença do produto e na indução de respostas de defesa em bagas de uva. Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação do efeito do fosfito sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação dos esporos para *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Experimentos utilizando-se de bagas foram conduzidos, visando avaliar o efeito no uso do fosfito como fungicida produtor ou curativo para os três patógenos. Cachos foram utilizados para se determinar os efeitos da aspersão do fosfito sobre a qualidade físico-química dos frutos. Para avaliação dos mecanismos de ação do fosfito sobre o micélio de *R. stolonifer*, foram determinados os efeitos sobre a permeabilidade da membrana plasmática, a síntese de parede celular e a síntese de proteínas. A atividade de guaiacol peroxidase e de compostos fenólicos totais foi determinada em bagas de uva tratadas ou não com fosfito. Houve inibição do crescimento micelial, da esporulação e da germinação dos esporos dos patógenos desenvolvidos em diferentes concentrações de fosfito de potássio. O tratamento protetor e curativo das bagas evidenciou reduções significativas na área abaixo da curva de progresso das doenças estudadas. Não houve efeito do produto sobre a qualidade físico-química dos cachos de uva. Quanto aos mecanismos de ação, foram observados efeitos do fosfito sobre a permeabilidade de membrana, devido à elevada perda de eletrólitos do micélio. O fosfito proporcionou elevação na síntese de proteínas totais no micélio do patógeno e redução na atividade de β-1,3-glucanase e quitinase, que são enzimas relacionadas à síntese de parede. A atividade de guaiacol peroxidase e a concentração de compostos fenólicos totais não aumentou com a aplicação do fosfito nas bagas. Desta forma, pode-se concluir que o fosfito de potássio controlou a podridão mole, o mofo cinzento e a podridão da uva madura e não teve efeito sobre a qualidade físico-química dos frutos. Ainda, o fosfito atuou sobre a permeabilidade de membrana, síntese de proteínas e de parede celular do micélio de *R. stolonifer* e não proporcionou indução da atividade de guaiacol peroxidase e compostos fenólicos totais em bagas de uva.

Palavras-chave: Ação fungitóxica; Controle alternativo; Sal inorgânico; *Vitis vinifera*

ABSTRACT

Potassium phosphite on postharvest disease control in ´Itália´ grape berries and possible mode of action to *Rhizopus stolonifer*

The occurrence of table grape diseases causes losses from the field to the commercialization, which affects the Brazil potential to export. The prevention of injuries in fruits is essential to ensure the pre- and postharvest treatment efficiency. In order to use alternative products to support the crop sustainable management, phosphite may be a useful tool. The phosphite effect on control of diseases caused by oomycetes has been reported, however, how the active ingredient acts on microorganisms from the Fungi kingdom is unknown. Thus, the objective was to evaluate potassium phosphite on the control of soft rot, grey mold and ripe rot, caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, respectively, in ´Itália´ grape berries and its effect on physico-chemical properties of the fruits. Moreover, the objective was to study the mode of action involved on the inhibition of *R. stolonifer* grown in the presence of phosphite and on the induction of defense responses in grape berries. *In vitro* assays were carried out to evaluate the effect of phosphite on mycelial growth, sporulation and spore germination in *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Single berries were used in order to evaluate the effect of phosphite as a protective or curative fungicide against the three pathogens. Grape clusters were used to determine the effects of phosphite spraying on physico-chemical properties. To evaluate the mode of action of phosphite on *R. stolonifer* mycelium the plasma membrane permeability, the protein synthesis and the cell wall synthesis were monitored. The guaiacol peroxidase activity and phenolic compound concentration were evaluated in grape berries treated or not with phosphite. There were inhibition on mycelial growth, sporulation and spore germination on the three pathogens in different potassium phosphite concentrations. The protective and curative treatment in grape berries showed significant reductions on the area under disease progress curve of the studied diseases. There was no effect on physico-chemical properties of the grapes. Regarding the mode of action, the phosphite affected membrane permeability what was seen as high electrolyte leakage from the mycelium. Phosphite caused high protein synthesis in the mycelium and reduction on β-1,3-glucanase and chitinase activities, which are enzymes related to cell wall synthesis. The guaiacol peroxidase activity and phenolic compound concentration did not increase due the phosphite application. Thus, it may be concluded that potassium phosphite controlled soft rot, grey mold and ripe rot in grape berries and did not affect the physico-chemical properties of the fruits. Besides that, phosphite still acted on membrane permeability, protein synthesis and cell wall synthesis on the *R. stolonifer* mycelium and did not changes in guaiacol peroxidase activity and phenolic compound concentration in the grape berries.

Keywords: Fungitoxic action; Alternative control; Inorganic salt; *Vitis vinifera*

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde 2001, a produção integrada de frutas (PIF) tem aos poucos se tornado realidade no Brasil. O objetivo da PIF é desenvolver um sistema de produção de alimentos de qualidade que vise a conservação dos recursos naturais e a minimização do uso de insumos poluentes ou resíduos de agrotóxicos de forma a garantir preservação do meio ambiente e a saúde humana. A adoção deste sistema leva a agregação de valor aos produtos, o que traz retorno econômico ao produtor (MAPA/Sislegis, 2001).

O manejo de doenças pós-colheita tem sido um entrave no sistema de produção (FISCHER et al. 2007; 2011; GALLI et al. 2012; HENZ et al. 2008; PEARSON; GOHEEN, 1990). Em uvas de mesa, diversas doenças estão relacionadas às perdas pós-colheita como *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides,* agentes causais da Podridão mole, do Mofo cinzento e da Podridão da uva madura.

A fragilidade das bagas às injúrias colabora para o incremento de perdas e, inclusive, a morfologia do fruto impede o emprego de tratamentos no controle de doenças (CAMILI; BENATO, 2005). A inexistência de fungicidas recomendados para o controle de doenças pós-colheita em uva (MAPA/Agrofit, 2013) é devido ao fato de que, exceto a raquis, todo o fruto é consumido, o que incrementaria os resíduos nos frutos e os riscos à saúde humana.

O atual controle de doenças pós-colheita em uva é realizado com pulverizações de fungicidas no campo (MAPA/Agrofit, 2013; GARRIDO; SÔNEGO, 2005) ou com sachês de metabissulfito de sódio, para a fumigação com dióxido de enxofre (SO_2) durante o transporte e o armazenamento dos frutos (EMBRAPA, 2005). Entretanto, existe limitação no uso desta técnica. A depender da variedade, as uvas podem sofrer danos durante a fumigação (PALOU et al., 2002; ZHANG et al., 2003) e o uso inadequado da técnica pode levar a liberação rápida de SO_2, com geração dos ácidos sulfuroso e sulfúrico, causando branqueamento nos frutos (CRISOSTO et al., 2002; ZOFFOLI et al., 2001). Além disso, para lavouras inseridas na agricultura orgânica, o uso do dióxido de enxofre não é permitido (MAPA, 2009).

A redução na disponibilidade de fungicidas convencionais efetivos tem aberto novos caminhos no manejo integrado de doenças de plantas pelo uso de produtos alternativos, ambientalmente corretos, como o uso de sais inorgânicos

(DELIOPOULOS; KETTLLEWELL; HARE, 2010), onde o fosfito de potássio torna-se uma alternativa no controle de doenças em campo e em pós-colheita (BRACKMANN et al. 2004; CERIONI et al. 2013a; KROMANN et al. 2012; PEREIRA et al. 2012).

Em alguns países, como Austrália, Estados Unidos e também na União Européia, os fosfitos tem sido empregados no controle de doenças de plantas em espécies florestais, frutíferas e hortícolas (HARDY; BARRET; SHEARER, 2001; LONG et al. 1989; McKAY et al. 1992; LEONARDI et al. 1999; BROWN et al. 2003; SALA et al. 2004; ABASSI; LAZAROVITZ, 2006; MILLER et al. 2006).

Levando-se em consideração o baixo risco à saúde exibido por produtos que contém resíduos de fosfito (EUROPEAN COMISSION, 2013) e o efeito deste produto no controle de doenças, o uso de fosfito de potássio em pós-colheita torna-se uma alternativa ambiental, social e economicamente vantajosa, já que os fosfitos são produtos de baixo custo. Entretanto, grande parte dos relatos disponíveis apresentam resultados quanto ao uso de fosfito de potássio no controle de doenças causadas por microrganismos do grupo dos Oomycetes. Ainda, a maior parte destes trabalhos apresenta aplicações no campo para a verificação do efeito em pós-colheita. Além disso, existe uma lacuna no entendimento do mecanismo de ação do fosfito de potássio sobre microrganismos do reino Fungi.

Desta forma, este trabalho tem como objetivos: a) avaliação do efeito *in vitro* de fosfito de potássio disponível comercialmente sobre microrganismos pertencentes ao reino Fungi, como *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*; b) avaliação do produto no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva individualizadas causadas por estes patógenos; c) avaliação da qualidade físico-química de bagas tratadas com o fosfito de potássio; d) verificação *in vitro* de possíveis mecanismos de ação de fosfito do potássio sobre *R. stolonifer.*

REFERÊNCIAS

ABASSI, P.A.; LAZAROVITZ, G. Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses Pythium damping-off cucumber seedlings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 459-464, 2006.

BRACKMANN, A.; GIEHL, R.F.H.; SESTARI, I.; STEFFENS, C.A. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs ‘Fuji’ durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34. n. 4, p. 1039-1042, 2004.

BROWN, S.; KOIKE, S.; OCHOA, O.; LAEMMLEN, F.; MICHELMORE, R. Insensitivity to the fungicide Fosetyl-aluminium in California isolates of the downy mildew pathogen *Bremia lactucae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 502-508, 2003.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A. Doenças da uva. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 50-55, 2005.

CERIONI, L.; RAPISARDA, V.A.; DOCTOR, J.; FIKKERT, S.; RUIZ, T.; FASSEL, R.; SMILANICK, J.L. Use of phosphate salts in laboratory and semicommercial tests to control citrus postharvest decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 97, p. 201-212, 2013.

CRISOSTO, C.H.; PALOU, L.; GARNER, D.; ARMSON, D.A. Concentration by time product and gas penetration after marine container fumigation of table grapes with reduced doses of sulfur dioxide. **HortTechnology**, Alexandria, v. 12, p. 241-245, 2002.

DELIOPOULOS, T.; KETTLLEWELL, P.S.; HARE, M.C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 1059-1075, 2010.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo da videira: colheita e pós-colheita. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. Versão eletrônica. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/colheita.htm Acesso em: 26 de novembro de 2013.

EUROPEAN COMISSION. Health & Consumers Directorate-General. Review report for the active substance potassium phosphonates. Brussels. 9p. 2013.

FISCHER, I.H.; ZANETTE, M.M.; SPOSITO, M.B.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja 'Valência' e caracterização da população fúngica em pomares orgânicos e convencionais. **Tropical Plant Pathology***,* Brasília, v. 36, n. 6, p. 390-399, 2011.

FISCHER, I.H.; ARRUDA, M.C.; ALMEIDA, A.M.; GARCIA, M.J.M.; JERONIMO, E.M.; PINOTTI, R.N.; BERTANI, R.M.A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 254-259, 2007.

GALLI, J.A.; FISCHER, I.H.; PALHARINI, M.C.A. Doenças pré e pós-colheita em variedades de manga cultivadas em sistema orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 734-743, 2012.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. **Podridão da Uva Madura ou Podridão de *Glomerella* – Biologia, Epidemiologia e Controle.** Bento Gonçalves: EMBRAPA, CNPUV, 2005. 10 p. (Circular Técnica, 52).Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.cnpuv.embrapa.br%2Fpublica%2Fcircular%2Fcir052.pdf&ei=8LGLUb_UEa640gHc2IGIAQ&usg=AFQjCNHwh6f2fqBsxkxCMcw3u_YDB3a31w&bvm=bv.46226182,d.dmQ. Acesso em: 09 maio 2013.

HARDY, G.E.S.; BARRET, S.; SHEARER, B.L .The future of phosphate as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 30, p. 133-139, 2001.

HENZ, G.P.; REIS, A.; SILVA, K.C.C.; PEREIRA, S.F. **Incidência de Doenças de Pós-Colheita em Frutos de Morango Produzidos no Distrito Federal.** Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 45. 8 p. 2008. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2008/bpd_45.pdf Acesso em: 21 abril 2013.

KROMANN, P.; PÉREZ, W.G.; TAIPE, A.; SCHULTE-GELDERMANN, E.; PRAKASH SHARMA, B.; ANDRADE-PIEDRA, J.L.; FORBES, G.A. Use of phosphonate to manage foliar potato late blight in developing countries. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1008-1015, 2012

LEONARDI, J. WILEY, A.W.; LANGDON, P.W.; PEGG, K.G.; CHEYNE, J. Progress on the use of foliar applications of phosphonate for the control of *Phytophthora* root rot in avocados. **Talking Avocados**, Brisbane, v. 10, n. 4, p. 18-20, 1999.

LONG, P.J.; MILLER, S.A.; DAVIS, S.K. Duration of fungicidal effect following injection of apple tress with fosetyl-Al. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 124, p. 89-96, 1989.

MAPA/Sislegis, 2001. Instrução Normativa 13/2001 de 13/12/2001. Definições e conceitos para o efeito da PIF. Disponível em: http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1362489091 Acesso em: 21 maio 2013.

MAPA, 2009. Instrução Normativa Conjunta 18/2009 de 28/05/2009. Regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_018_de_28-05-2009.pdf Acesso em: 28 nov. 2013.

MAPA/Agrofit, 2013. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 04 maio 2013.

McKAY, A.; FLOYD, R.; BOYD, C. Phosphonic acid controls downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower curds. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 32, p. 127-129, 1992.

MILLER, J.S.; OLSEN, N.; WOODELL, L.; PORTER, L.D.; CLAYSON, S. Post-harvest applications of zoxamide and phosphate for control of potato fiber rots caused by oomycetes at harvest. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 83, p. 269-278, 2006.

PALOU, L.; CRISOSTO, C.H.; GARNER, D.; BASINAL, L.M.; SMILANICK, J.L.; ZOFFOLI, J.P. Minimum constant sulfur dioxide emission rates to control gray mold of cold-stored table grapes. **American Journal Enology and Viticulture**, Davis, v. 53, p. 110-115, 2002.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. (Ed.). **Compendium of Grape Diseases**. St. Paul, Minessota: American Phytopathological Society, 1990. 93p.

PEREIRA, V.F.; REZENDE, M.L.V.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; REGINA, M.A.; MOTA, R.V.; VITORINO, L.R.R. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, 2012.

SALA, F.C.; DA COSTA, C.F.; ECHER, M.M.; MARTINS, M.C.; BLAT, S.F. Phosphite effect on hot and sweet pepper reaction to *Phytophthora capsici*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 462-495, 2004

ZHANG, H.; WANG, S.; XIU, D.; GUO, Y.; LI, L.; GUAN, W.; LUO, Y.; KONG, Q. Studies on the relationship of the microstructure of 'Red Globe´ grape epidermis, enzyme activity and SO_2 damage. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 628, p. 555-561, 2003.

ZOFFOLI, J.P.; RODRÍGUEZ, J.; LEVY, N.; JOUI, M. Importancia de la fase rapida del generador de anhidrido sulfuroso en el blanqueamiento de la uva de mesa. **Aconex**, Santiago, v. 71, p. 10-15, 2001.

2 FOSFITO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE DOENÇAS PÓS-COLHEITA EM BAGAS UVA 'ITÁLIA'

Resumo

As uvas de mesa exigem um adequado manejo para minimização das perdas decorrentes de doenças pós-colheita, como a podridão mole, o mofo cinzento, a podridão da uva madura, dentre outras. Atualmente, fungicidas de alta toxicidade são usados em pré-colheita para o controle de podridões. Aliado ao controle com agrotóxicos, a fumigação com dióxido de enxofre é rotineiramente utilizada em pós-colheita. Produtos alternativos para o controle, como o fosfito de potássio, possuem baixo custo e baixa toxicidade ao homem. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do fosfito de potássio no controle da podridão mole, do mofo cinzento e da podridão da uva madura, e seus efeitos na qualidade físico-química dos frutos. O desenvolvimento *in vitro* de *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* em várias concentrações de fosfito foi testado. Foram realizados ensaios em bagas individualizadas para avaliação dos efeitos protetor e curativo do produto. Ainda, avaliou-se a qualidade físico-química de cachos tratados com fosfito. Observou-se inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos dos três patógenos em concentrações crescentes de fosfito *in vitro*. A esporulação do patógeno *in vitro* foi inibida em cerca de 100% no cultivo em meio com adição do produto. A área abaixo da curva de progresso da doença, quanto à incidência para os tratamentos protetor e curativo nas três doenças, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). A redução mais expressiva foi observada no tratamento curativo da podridão mole, que apresentou redução de aproximadamente 60% na incidência da doença. A aplicação do produto não influenciou negativamente a qualidade físico-química dos cachos. Pode-se concluir que o fosfito de potássio controla *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides* em uvas nas condições estudadas e que o produto não reduz a qualidade dos frutos.

Palavras-chave: Controle alternativo; Patologia pós-colheita; Sal inorgânico

Abstract

Grape berries require an appropriate management to minimize the postharvest losses due soft rot, grey mold and ripe rot. Currently, high toxicity fungicides have been used in pre harvest to control decays. Associate to pesticides, the fumigation with sulfur dioxide have been routinely used. Alternative products for disease control, as potassium phosphite, have low cost and low human toxicity. Thus, the objective of this work was to evaluate commercial potassium phosphite to control soft rot, grey mold and ripe rot diseases in grapes and its effect on physical and chemical properties. The *in vitro* development of *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* was studied by using different phosphite concentrations. Assays using single grape berries to evaluate the protective and curative phosphite action were treated with phosphite. Moreover, the physical and chemical properties of grape clusters phosphite were evaluated. There was mycelial growth and spore germination inhibition on the three pathogens as phosphite concentration increased. The *in vitro* sporulation was inhibited 100% in the culture medium with phosphite. The area under the disease progress curve concerning incidence in the protective and curative

treatments on the three diseases showed statistical differences ($p < 0,05$). The most expressive reduction was seen in the curative treatment of soft rot that provided a reduction of 60% in incidence. The phosphite did not influence grape clusters physical and chemical properties. It can be concluded the potassium phosphite is able to control *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides* in grapes under this studied conditions and the product do not reduce the fruit quality.

Keywords: Alternative control, postharvest diseases, inorganic salt

2.1 Introdução

O cultivo da videira é realizado há milhares de anos e provavelmente foi uma das primeiras frutas a ser consumida pelo homem (CORRÊA; BOLIANI, 2001). Dados recentes, divulgados pela Organização das Nações Unidas pela Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO), apontam que cerca de 70 milhões de toneladas de uva são produzidas em todo o mundo sendo que a China, Itália, Estados Unidos, França e Espanha são os maiores produtores (FAOSTAT, 2011).

Embora seja o terceiro maior produtor mundial de frutas, devido às excelentes condições climáticas para o cultivo de fruteiras tropicais e temperadas, o Brasil encontra-se como 12° produtor mundial de uvas e, assim, tem pequena participação na produção mundial e exportação da fruta *in natura* (FACCHINELLO; NACHTIGAL, 2009; FAOSTAT, 2011). Porém, nos últimos anos, de acordo com estatísticas da FAOSTAT (2011), o Brasil tem se destacado em termos de produção, exportação, importação e consumo deste produto.

A FAO recentemente apresentou uma alarmante situação na produção de alimentos: anualmente, cerca de um terço da produção mundial de alimentos para consumo humano é perdida ou desperdiçada, sendo que 45% deste montante é referente à frutas, verduras, tubérculos e raízes (FAO, 2013a). Os desperdícios são maiores em países desenvolvidos (FAO, 2013a), porém, as perdas de alimentos ocorrem desde as etapas de produção, colheita até o transporte e armazenamento (PARFITT; BARTEHT; MCHAUGHTON, 2010). Ressalta-se que dentre os fatores que influenciam as perdas pós-colheita está a ocorrência de doenças. Na pós-colheita de uvas de mesa pode-se citar a Podridão mole, causada por *Rhizopus stolonifer*, o Mofo cinzento, cujo agente causal é *Botrytis cinerea* e a Podridão da uva madura, incitada por *Colletotrichum gloeosporioides*, que acometem os frutos trazendo grandes prejuízos.

Vários métodos podem ser aplicados para redução destas perdas como erradicação de frutos doentes, manuseio cuidadoso na colheita, transporte e armazenamento, a fim de se evitar a ocorrência de injúrias e o controle químico na pré- e pós-colheita (OLIVEIRA et al. 2006). Aliado à estes métodos, pode-se integrar o controle físico, por meio de tratamento térmico e armazenamento refrigerado (NARAYANASAMY, 2006).

Entretanto, o uso de agrotóxicos na pós-colheita torna-se um problema devido aos resíduos que tornam o produto menos atrativo para o consumidor e ainda devido à sua toxicidade ao ambiente e animais (AGRIOS, 2005). A sociedade atual tem revelado uma nova postura frente à qualidade de alimentos, priorizando a redução no uso de agrotóxicos e, consequentemente, o consumo de alimentos com menores resíduos destes produtos.

Neste contexto, novos métodos tem sido testados e avaliados para uso em pós-colheita. No Brasil, o fosfito é recomendado como fertilizante foliar, porém, em diversos países como Estados Unidos, Austrália, além de países da Europa, este produto é utilizado no manejo de doenças causadas por Oomicetos (HARDY et al. 2001; LONG et al. 1989; SALA et al. 2004; MILLER et al. 2006; KOUSIK et al. 2011; BOCK et al. 2013). Ainda, há relatos na literatura sobre a utilização de fosfito no controle de doenças pós-colheita, porém, o uso deste produto no controle de doenças incidentes em uvas de mesa ainda não foi descrito.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do fosfito de potássio disponível comercialmente sobre *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides in vitro* e também no controle preventivo e curativo das doenças causadas por estes patógenos em bagas individualizadas de uva ´Itália´ e, assim como os seus efeitos na qualidade físico-química dos frutos.

2.2 Revisão Bibliográfica

2.2.1 Doenças pós-colheita em uvas

Diversas doenças causam podridões pós-colheita em uvas de mesa, a grande maioria delas, de etiologia fúngica. De acordo com Tavares; Silva (2005), estas doenças podem ser classificadas em adquiridas ou quiescentes, dependendo do fenômeno ocorrente na infecção do patógeno. As infecções quiescentes podem ser inibidas devido a presença de compostos pré-formados que induzem a quiescência, como compostos fenólicos e taninos, que modulam a expressão da doença, a qual é

evidenciada no amadurecimento do fruto (PRUSKY, 1996). Como exemplo de patógenos que ocasionam infecções quiescentes tem-se *Colletotrichum*, *Monilinia* e *Botrytis,* dentre outros (BRUCE, 2010; KOBILER et al., 2001; LUO; MICHAILIDES, 2001; SANZANI et al. 2012). Já nas infecções adquiridas, a manifestação dos sintomas das doenças ocorre rapidamente após a infecção, as quais são causadas principalmente por *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* (GONÇALVES et al. 2010; MONTESINOS-HERRERO et al., 2009; YOUSSEF et al. 2012). Dentre os patógenos citados acima, três deles são alvo deste estudo, os quais são *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides.* Estes microrganismos ocorrem em alta incidência como causadores de podridões pós-colheita em uvas de mesa.

A Podridão mole, causada por *Rhizopus stolonifer* [(Ehrenb.: Fr.) Vuill 1902], está presente na maioria das regiões produtoras de uva (TAVARES; SILVA, 2006), sendo sua ocorrência elevada em bagas maduras e em locais com alta umidade (WEBSTER; WEBBER, 2005). Atualmente é sabido que *R. stolonifer* é capaz de penetrar diretamente o tecido intacto do hospedeiro e ferimentos no pedúnculo liberam sustâncias ricas em nutrientes, as quais propiciam a germinação dos esporos do patógeno e a ocorrência da doença (BAGGIO, 2012).

Com relação aos sintomas, primeiramente, ocorre o escurecimento da casca, seguido do desenvolvimento de micélio de coloração esbranquiçada, o qual torna-se escurecido com a maturação dos esporângios (CAMILI; BENATO, 2005; TAVARES; SILVA, 2006). O tecido afetado torna-se mole e aquoso com a liberação de um líquido com odor desagradável e, posteriormente, o patógeno é capaz de colonizar o cacho completamente (CAMILI; BENATO, 2005). A sobrevivência deste patógeno dá-se no solo e em restos culturais e a grande massa de esporos produzida pode ser disseminada pelo vento, sendo que a elevada umidade relativa favorece o desenvolvimento do patógeno (TAVARES; SILVA, 2005).

Botrytis cinerea [Pers. 1976], cujo teleomorfo é *Botryotinia fuckeliana* [(de Bary) Whetzel 1945], é o agente etiológico do Mofo cinzento, a podridão mais importante em uvas de mesa, que pode gerar mais de 50% de perdas. Após a colheita, sérios danos em frutos que apresentavam-se saudáveis são observados, o que prejudica a exportação (WILLIAMSON et al. 2007). A sintomatologia da doença é caracterizada por manchas de cor marrom, com ruptura da película da baga, posterior flacidez e aparecimento de micélio de coloração acinzentada (CAMILI; BENATO, 2005; RIBEIRO, 2001).

O ciclo da doença pode ser iniciado no campo, pela infecção da inflorescência, ramos e folhas jovens por esporos dispersos pelo vento no campo, porém, o patógeno permanece quiescente até a maturação da baga, quando iniciam-se os sintomas (FLAHERTY, 1992). Além disso, esporos de *Botrytis* sp. podem penetrar a epiderme da baga, o que leva a ocorrência da doença tanto em pré- quanto em pós-colheita. A infecção precoce leva à seca e queda da inflorescência (PEARSON; GOHEEN, 1988). Esta doença é problemática em regiões de alta umidade relativa e clima ameno, como na região Sul do Brasil, o que favorece o crescimento, esporulação, germinação e infecção (AGRIOS, 2005). Devido às oscilações de temperatura durante o transporte e armazenamento, o patógeno pode se desenvolver e colonizar rapidamente outros cachos presentes na mesma embalagem. Mesmo em condições de armazenamento refrigerado pode ocorrer o desenvolvimento da doença (CAMILI; BENATO, 2005; PEARSON; GOHEEN, 1988, TAVARES; SILVA, 2006).

Frutos mumificados, ramos e folhas senescentes ou em decomposição são fonte de inóculo para o próximo ciclo da cultura. Sob condições favoráveis, estruturas de resistência do patógeno, como micélio e escleródios, desenvolvem-se e por meio de chuva e vento tornam-se fonte de inóculo para a infecção de flores, folhas e cachos jovens (FLAHERTY, 1992; PEARSON; GOHEEN, 1988).

Por sua vez, *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz e Sacc. 1884] (teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. e H. Schrenk) é o agente causal da Podridão da uva madura. Os sintomas tornam-se evidentes à partir da maturação dos frutos devido à infecção quiescente, porém, o fruto é suscetível em qualquer estádio de desenvolvimento (GARRIDO; SÔNEGO, 2004; AMORIM; KUNIYUKI, 2005).

Os sintomas da doença são manchas marrons circulares que evoluem em tamanho, tornando-se escurecidas. Em condições climáticas de elevada umidade relativa e temperatura, a mucilagem alaranjada característica deste patógeno, na qual estão presentes os conídios do patógeno, torna-se evidente. Durante o período chuvoso, os conídios presentes na mucilagem hidrossolúvel são dispersados pela água e pelo vento atingindo inflorescências (AGRIOS, 2005; FLAHERTY, 1992; GOHEEN, 1988)

A doença leva a queda das bagas, folhas e ramos infectados, favorecendo a sobrevivência do patógeno no solo entre estações de cultivo (AGRIOS, 2005; RIBEIRO, 2001).

2.2.2 Manejo de doenças pós-colheita em uva

Grande parte das podridões pós-colheita iniciam-se no campo. Portanto, o manejo de doenças que podem infectar os frutos no campo, deve ser priorizado também antes da colheita, para a redução de perdas de origem fitopatológica até o consumo.

Medidas como planejamento na formação do vinhedo, procurando fornecer adequada ventilação ao pomar e adubação equilibrada são necessárias para que doenças, em geral, não sejam favorecidas. A retirada de frutos doentes do vinhedo e o controle químico com produtos recomendados para a cultura devem ser realizados, respeitando-se os intervalos de segurança (CAMILI; BENATO, 2005; GARRIDO; SÔNEGO, 2004).

Em todos os períodos de desenvolvimento do fruto e, principalmente, após a maturação deve-se evitar a realização de injúrias, as quais atuam como porta de entrada e favorecem a penetração de patógenos. Além disso, a correta sanitização dos utensílios utilizados na colheita e armazenamento como tesouras, caixas, galpões e câmaras de armazenamento deve ser realizada para se evitar a disseminação do patógeno (TAVARES; SILVA, 2006).

Na rotina de campo, os parreirais recebem sucessivas pulverizações com fungicidas após o florescimento, o que reduz, mas não elimina a ocorrência de podridões pós-colheita (LUVISI et al. 1992; SMILANICK et al. 2010), sendo que os grupos químicos utilizados com maior frequência são estrobilurina, benzimidazol, ditiocarbamato, além do ingrediente ativo fosetyl-alumínio, que é muito utilizado no controle do míldio (MAPA/Agrofit, 2013).

Atualmente, no Brasil não há fungicidas recomendados para aplicação pós-colheita em uva (CASTILLO et al. 2010; MAPA/Agrofit, 2013), devido ao elevado período de carência exigido pelos produtos existentes. Na prática, o controle tem sido realizado com dióxido de enxofre durante o armazenamento dos frutos à baixa temperatura (EMBRAPA, 2010). Entretanto, esta prática não é permitida no cultivo de uvas no manejo orgânico (MAPA, 2009). Assim, o estudo de alternativas para o manejo pós-colheita de uvas de mesa se faz necessário, o que já tem sido realizado

há décadas, principalmente após a ascensão da agricultura orgânica e a conscientização da população sobre os resíduos de agrotóxicos nos frutos (ROMANAZZI et al. 2012).

A literatura aponta diversos estudos que demonstram a eficiência de outras técnicas de manejo como as irradiações ultra-violeta C (NIGRO et al., 1998), ozonização (MLIKOTA GLABER et al., 2010), vaporização com ácido acético (CAMILI et al., 2010) e etanol (CHERVIN et al., 2005), quitosana (MUÑOZ; MORET; GARCÉS, 2009; ROMANAZZI et al. 2002), agentes de controle biológico, como leveduras (ZAHAVI et al., 2000), indutores de resistência, como metil jasmonato (ROHWER; ERWIN, 2008) e sais inorgânicos, como bicarbonato de sódio e fosfito de potássio (DELIOPOULOS; KETTLLEWELL; HARE, 2010; MLIKOTA GABLER; SMILANICK, 2001; FELIZIANI et al. 2013; MONOSCO-RAMÍREZ; MONTESINOS-HERRERO; PALOU, 2013).

2.2.3 Uso de fosfito no controle de doenças pós-colheita

Os fosfitos são compostos provenientes do ácido fosforoso (H_3PO_3), originados através de uma reação de neutralização com uma base, como hidróxido de potássio, o qual é o mais frequentemente utilizado para este fim. Um dos produtos desta reação é o fosfito de potássio (K_2HPO_3) (McDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001).

Inicialmente, os fosfitos foram estudados e utilizados como fertilizante foliar, como fonte de fósforo. Porém, este produto não demonstrou ser uma eficiente fonte deste elemento (GUEST; GRANT, 1991). Anos mais tarde, descobriu-se a atividade fungicida contra microrganismos da classe Oomycetes, como *Phytophthora*, *Plasmopara* e *Pythium*. Em seguida, foi lançado o Aliette®, cujo princípio ativo é o fosetyl-alumínio, que após a hidrólise do etil-fosfonato libera moléculas de fosfito, as quais atuam na proteção da planta e tem a capacidade de translocar via floema e xilema (McDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001).

O fosfito de potássio, que é recomendado no Brasil como fertilizante foliar, é um produto de baixo custo, não fitotóxico e de baixa toxicidade à mamíferos (DALIO et al., 2012). O limite máximo de resíduo (LMR) para o fosfito de potássio ou ácido fosforoso, reagente utilizado na obtenção do fosfito, é estabelecido em poucos países. No Brasil, por exemplo, não há LMR determinado pela ANVISA para o fosfito ou ácido fosforoso para nenhuma cultura, e o mesmo ocorre no Codex Alimentarius (ANVISA, 2013; FAO, 2013b). Nos Estados Unidos, há regulamentação para ácido

fosforoso e seus sais, inclusive o fosfito de potássio, porém, a tolerância não é obrigatória. Contudo, na utilização do produto como fungicida ou em tratamentos pós-colheita em batatas, o resíduo deve ser menor do que 35.600 ppm (GPO, 2013).

Recentemente, o Diretório Central de Saúde e Consumidores da União Europeia (do inglês Directorate General for Health & Consumers - European Commission) citou em relatório publicado em Março de 2013 sobre o ingrediente ativo fosfito de potássio que "*a revisão estabelece que os resíduos resultantes de utilizações propostas, consecutiva a uma boa prática fitossanitária, não tem efeitos nocivos sobre a saúde humana e animal"* (EUROPEAN COMISSION, 2013). Desta forma, o consumo de alimentos com resíduos de fosfito de potássio não é nocivo à saúde.

Há relatos do uso de fosfito de potássio no controle de podridões pós-colheita em diversos frutos como pêssegos, no controle da podridão parda (MOREIRA et al., 2002), em manga, no controle da antracnose (ZAINURI et al. 2001), em maçãs, no controle do mofo-azul (AMIRI; BOMPEIX, 2011; BLUM et al., 2007; BRACKMANN et al., 2004) e em citros, no controle de bolores (CERIONI et al. 2013a; SMILANICK, 2011). Entretanto, para uvas de mesa não existem relatos sobre sua utilização no controle de doenças pós-colheita e seus efeitos nesta fase.

2.3 Material e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. As análises físico-químicas foram executadas no Laboratório de Pós-colheita de Plantas Hortícolas, também situado na ESALQ/USP, coordenado pelo Prof. Dr. Ângelo Jacomino.

2.3.1 Isolados fúngicos e produção de inóculo

Foram utilizados isolados de fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas de mesa, os quais estão discriminados na Tabela 1. Os isolados de *Rhizopus stolonifer, Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos junto ao Laboratório de Epidemiologia (ESALQ/USP), Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita (UFV) e Embrapa Uva e Vinho, respectivamente. Os microrganismos foram cultivados em fotoperíodo de 12 horas para *B. cinerea* e *C.*

gloeosporioides e em luz contínua para *R. stolonifer* sendo utilizado o meio batata-dextrose-ágar (BDA) para os três patógenos.

Tabela 1 - Isolados fúngicos dos patógenos utilizados neste trabalho, procedência e cultivo

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Meio de cultivo	Dias de cultivo[4]
R. stolonifer	-[1]	Pêssegos	BDA	1 a 2
B. cinerea	CCF 109[2]	Morangos	BDA	3 a 10
C. gloeosporioides	CNPUV 381[3]	Uva Variedade Cabernet Sauvignon	BDA	7

[1] Fornecido pelo Laboratório de Epidemiologia (ESALQ/USP), o qual não possui código de depósito
[2] Fornecido pelo Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita (UFV)
[3] Fornecido pela Embrapa Uva e Vinho
[4] Dias de cultivo para uso nos ensaios

2.3.2 Obtenção das bagas de uva

Os frutos foram obtidos na Central de Abastecimento de Campinas – CEASA S.A. Os cachos de uva de mesa da variedade 'Itália' (*Vitis vinifera*), provenientes de São Miguel Arcanjo e Jales - SP, Marialva - PR, foram colhidos cerca de 36 horas antes da comercialização.

Em laboratório, as bagas de uva foram selecionadas com exclusão daquelas que possuíam injúrias, sendo uniformizadas quanto ao tamanho. Procedeu-se a desinfestação superficial com hipoclorito de sódio 0,05% por três minutos e, em seguida, as bagas foram colocadas em recipiente com água para retirada do excesso do agente desinfestante, sendo, posteriormente, dispostas para secar a temperatura ambiente. Após a secagem, as bagas foram limpas com algodão úmido para a retirada de possíveis resíduos, os quais poderiam estar presentes na superfície do fruto.

2.3.2.1 Teste de patogenicidade para os isolados de *R. stolonifer* e *B. cinerea*

Como os isolamentos de *R. stolonifer* e *B. cinerea* não foram realizados à partir de frutos de uva, procedeu-se um teste para verificação do potencial destes isolados em infectar uvas.

Bagas de uva 'Itália' individualizadas foram feridas com agulha histológica e, em seguida, um disco de 5 mm de meio BDA (obtido conforme item 2.3.1), contendo micélio do patógeno, foi transferido para o local do ferimento. Um fragmento de fita adesiva foi aderido 2 mm abaixo do ápice da agulha, delimitando, assim, a profundidade do ferimento.O material foi mantido em câmara úmida e diariamente foi observado o aparecimento dos sintomas nas bagas.

2.3.3 Fosfito de potássio

Como fonte de fosfito de potássio foi o utilizado o Phytogard®, o qual é produzido comercialmente pela Stoller do Brasil LTDA. Este produto possui 28% de P_2O_5, cuja fonte é o ácido fosforoso e 26% de K_2O, com densidade de 1,51 g L^{-1}, sendo que o pH do produto é 7. As doses utilizadas neste trabalho e seus respectivos valores em fosfito de potássio estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Doses de Phytogard® e seus respectivos valores em fosfito de potássio

Dose de Phytogard® (mL L^{-1})	Fosfito de potássio (g L^{-1})
0 (controle)	0
2,5*	1,19
5	2,38
10	4,76
25	12
50	24

*Dose recomendada pelo fabricante como fertilizante foliar na cultura da videira

2.3.4 Efeito do fosfito de potássio sobre o desenvolvimento *in vitro* de *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides*

2.3.4.1 Efeito sobre o crescimento micelial e a esporulação *in vitro*

Foram utilizadas placas de poliestireno disponíveis comercialmente, contendo 20 mL meio de cultivo batata-dextrose-ágar – BDA (39 g L^{-1} de meio de cultivo Oxoid® autoclavado por 20 minutos à 1 atm e 121 °C). O fosfito de potássio foi incorporado ao meio de cultivo à temperatura de aproximadamente 50 °C nas concentrações apresentadas na Tabela 2. Discos de micélio de 5 mm do patógeno, cuja idade está explicitada na Tabela 1, foram transferidos para o centro da placa. As placas foram mantidas em câmaras incubadoras tipo B.O.D. à 28 °C com luz fluorescente contínua para *R. stolonifer,* 22 ºC com fotoperíodo de 12 horas para *B. cinerea e* 25 °C com fotoperíodo de 12 horas para *C. gloeosporioides*.

As avaliações foram efetuadas no dia em que as colônias dos tratamentos controle atingiram os bordos, cujo período foi de 1, 3 e 10 dias para *R. stolonifer*, *B. cinerea e C. gloeosporioides,* respectivamente. Cada avaliação consistiu de duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia com o auxílio de um paquímetro digital. Com os resultados obtidos, foi calculada a inibição do crescimento micelial do patógeno, expressa em porcentagem, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Inibição} = (Dc - Dt) / Dc \times 100$$

Dc = diâmetro da colônia no tratamento controle
Dt = diâmetro da colônia em uma determinada dose

À partir destes dados foi obtida uma regressão para determinação da CE_{50}, a qual representa a concentração efetiva de Phytogard® capaz de inibir em cinquenta por cento o crescimento micelial do patógeno (RUSSEL, 2002). Com base nesses valores foi possível comparar a sensibilidade dos isolados destes patógenos ao fosfito de potássio.

Para a avaliação do efeito fungistático ou fungicida do fosfito, após aferição do diâmetro das colônias, os discos de micélio utilizados ao iniciar o ensaio foram transferidos para placas contendo apenas meio de cultivo BDA, onde o desenvolvimento de cada microrganismo foi observado.

Para a avaliação do efeito de diferentes doses de fosfito de potássio sobre a esporulação do patógeno, após a retirada do disco de micélio que originou a colônia, 10 mL de água destilada foram adicionados à placa e, em seguida, com o auxílio de uma alça de Drigalski, os esporos foram desalojados através da raspagem da colônia. Posteriormente, 200 µL da suspensão foram transferidos para câmara de Neubauer para a contagem dos esporos. Novamente, a porcentagem de inibição da esporulação *in vitro* foi calculada através da mesma fórmula empregada para a inibição do crescimento micelial, além do cálculo da CE_{50}.

Estes ensaios foram instalados em delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições por tratamento, sendo cada placa considerada uma repetição.

2.3.4.2 Efeito sobre a germinação dos esporos *in vitro*

Para a avaliação do efeito do fosfito de potássio sobre a germinação dos esporos foram utilizadas placas de poliestireno tipo ELISA. Em cada cavidade da placa foram adicionados 20 µL da suspensão de esporos e 20 µL da solução de fosfito de potássio, de forma que a concentração final de esporos fosse 1×10^5 esporos mL^{-1} com a adição de 0,05% de Tween 20, sendo que as concentrações finais de fosfito de potássio foram as mesmas apresentadas na Tabela 2. Apenas a suspensão de *R. stolonifer* foi preparada em solução nutritiva, cuja composição foi: 20 g glicose, 2 g de asparagina, 0,5 g de KH_2PO_4 e 26 g de $MgSO_4$ em 1 L de água

(modificada de VAN ETTEN et al., 1969). Esta solução foi utilizada, visto que a germinação foi praticamente nula nos testes preliminares realizados.

As condições de incubação foram 25 °C no escuro durante 16 horas para *C. gloeosporioides*, 28 °C em luz contínua para *R. stolonifer* e 22 °C em fotoperíodo de 12 horas para *B. cinerea.* A germinação dos esporos foi paralisada após 16, 8 e 24 horas para os fungos *C. gloeosporioides*, *R. stolonifer* e *B. cinerea*, respectivamente, com a adição de 20 µL de lactoglicerol. A avaliação foi realizada em aumento de 320 vezes em microscópio de luz invertido. Foram contabilizados 50 esporos por cavidade, sendo os resultados expressos em porcentagem. Este ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento, sendo cada cavidade da placa considerada uma repetição.

2.3.5 Efeito do fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em uva 'Itália' causadas por *C. gloeosporioides*, *R. stolonifer* e *B. cinerea*

2.3.5.1 Teste preliminar de inoculação de *R. stolonifer* em bagas de uva 'Itália' individualizadas

Nos ensaios com os frutos foram utilizadas bagas de ´Itália´ individualizadas, devido a limitação de espaço físico para o desenvolvimento do trabalho com cachos.

Este ensaio foi instalado de forma a verificar o método adequado para a inoculação de *R. stolonifer*, já que, *in vitro*, a germinação foi observada apenas na presença de solução nutritiva. As bagas foram dispostas em duas bandejas plásticas com quinze cavidades cada, as quais foram marcadas com um círculo com auxílio de uma caneta para retroprojetor, para evidenciar a área em que a inoculação foi realizada. Em cada bandeja, nove das quinze bagas foram feridas com agulha histológica com profundidade de 2 mm (item 2.3.2.1).

Duas suspensões de esporos de *R. stolonifer* foram preparadas na concentração de 1 x 10^5 esporos mL^{-1}, sendo uma em água e outra em solução nutritiva, conforme mencionado no item 2.3.4.2, acrescidas de Tween 20 à 0,05%. Em seguida, 10 µL de uma suspensão de esporos de *R. stolonifer* foram pipetados no centro da área previamente marcada nas bagas, sendo que, nas bagas feridas, a inoculação foi exatamente sobre o ferimento. Em uma bandeja foi realizada a inoculação utilizando-se apenas de esporos em água enquanto que, na outra, utilizou-se da suspensão preparada em solução nutritiva.

As bandejas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente e no escuro, sendo que os sintomas foram avaliados durante quatro dias.

2.3.5.2 Uso do fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva 'Itália' individualizadas

Buscou-se avaliar o efeito da aplicação de fosfito de potássio pré e pós-inoculação, com o objetivo de se verificar a atuação do produto como fungicida protetor e curativo, respectivamente. Para tanto, os ensaios foram instalados baseados em Camili et al. (2010) e Abreu et al. (2008).

2.3.5.2.1 Avaliação do efeito protetor de fosfito de potássio

Posteriormente à secagem dos frutos realizada após a desinfestação superficial, doze bagas foram dispostas em cada bandeja, a qual foi colocada dentro de outra bandeja de poliestireno expandido sobre papel filtro. Posteriormente, as bagas foram marcadas na região oposta à inserção à ráquis com caneta para retroprojetor com um círculo, sendo, em seguida, feridas com agulha histológica à 2 mm de profundidade no centro da região marcada.

Para os ensaios com frutos foram utilizadas as concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®. Os frutos foram aspergidos com a respectiva solução até o ponto de escorrimento e deixados novamente para secar a temperatura ambiente por 16 horas.

A suspensão de esporos foi ajustada para 1 x 10^5 conídios mL^{-1}, contendo 0,05% de Tween 20, sendo esta preparada em água, para os três patógenos. A inoculação foi realizada pela pipetagem de 10 µL da suspensão de esporos sobre o ferimento. Cerca de 20 mL de água destilada foram adicionados ao papel filtro disposto na bandeja de poliestireno expandido e, em seguida, cada bandeja foi mantida fechada com saco plástico umidificado por 24 horas, mantendo-se elevada umidade relativa. As bandejas foram mantidas em câmaras de germinação, tipo B.O.D., à 25 °C no escuro sob umidade relativa de 80 ± 5% (Figura 1).

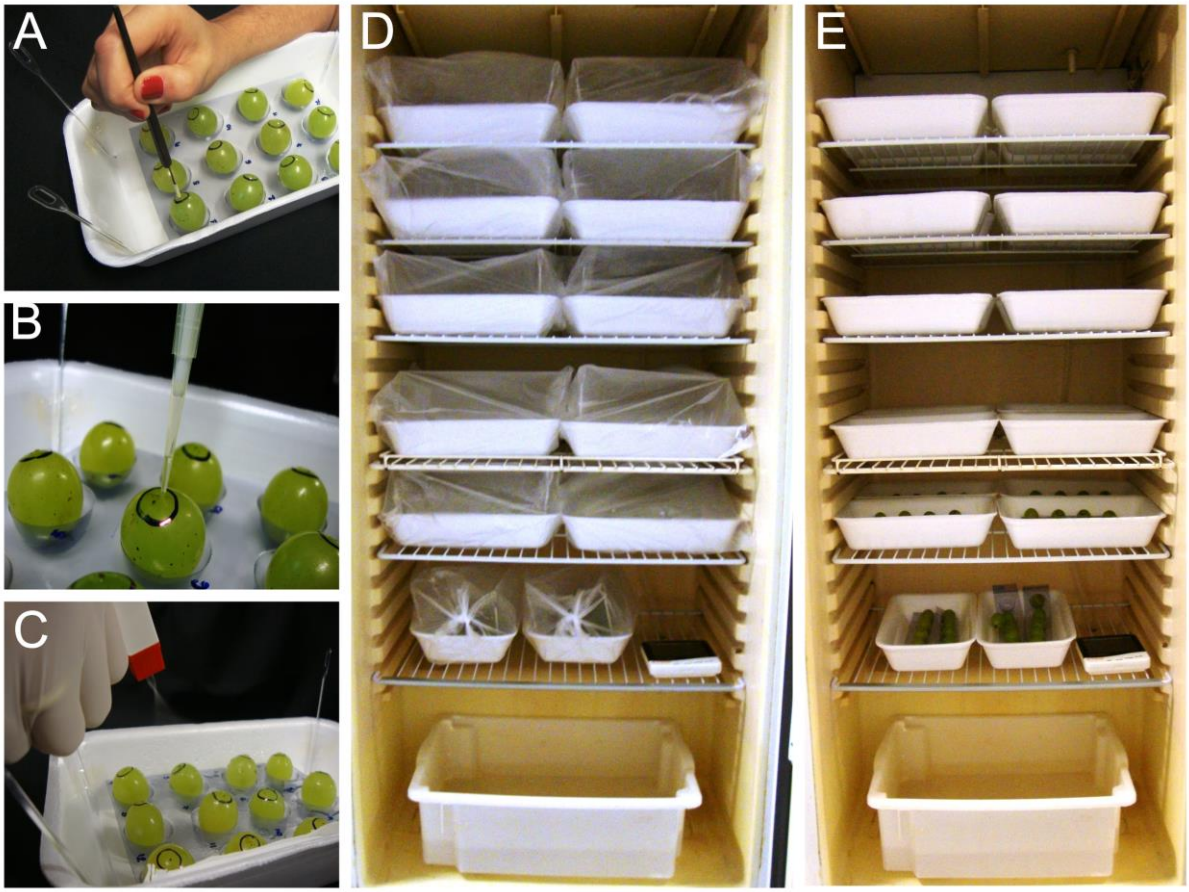


Figura 1 - Instalação dos ensaios *in vivo*. Realização de ferimento nas bagas (A); deposição de 10 µL da suspensão de esporos calibrada à 1 x 10^5 esporos mL^{-1} sobre o ferimento (B); aspersão das soluções de fosfito (C); manutenção das bagas em câmara úmida (D) e manutenção das bagas após câmara úmida

A avaliação de cada baga foi realizada a cada 24 horas após inoculação, observando-se a incidência da doença. À partir dos dados obtidos calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (BERGER, 1988) para a incidência, para cada tratamento e para os três patógenos estudados.

O ensaio foi instalado em delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma bandeja contendo 12 bagas.

2.3.5.2.2 Avaliação do efeito curativo de fosfito de potássio

Novamente, após a secagem, as bagas foram organizadas em bandejas, as quais continham 12 unidades. O material foi colocado sobre papel filtro em bandeja de poliestireno expandido.

Posteriormente, a região de inoculação situada do lado oposto à inserção à ráquis foi marcada com caneta de retroprojetor e, em seguida, um ferimento de 2 mm de profundidade foi realizado com o auxílio de uma agulha histológica.

A inoculação foi realizada pela deposição de 10 µL da suspensão de esporos, calibrada em câmara de Neubauer à 1 x 10^5 esporos mL^{-1}, acrescida de 0,05% de Tween 20. As bandejas foram mantidas em câmara úmida por 2,5 horas para *R. stolonifer* e quatro horas para *B. cinerea* e *C. gloeosporioides* e, em seguida, realizada a aspersão da solução de Phytogard®, nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1}.

As avaliações foram realizadas diariamente, sendo que, a primeira avaliação foi realizada 24 horas após a inoculação do patógeno. Os dados coletados foram utilizados para o cálculo da AACPD, conforme citado no item 2.3.5.2.1.

O delineamento utilizado neste ensaio foi de blocos casualizados com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição composta por 12 bagas.

2.3.5.2.3 Avaliação da esporulação de *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* sobre bagas de uva ´Itália´ tratadas com fosfito de potássio

Ao final dos experimentos realizados com *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides*, foi avaliada a esporulação do patógeno na superfície das bagas. Os esporos presentes na superfície de cada baga foram removidos com o auxílio de um pincel umedecido, para evitar a dispersão destes. Posteriormente, o material foi depositado em 20 mL de água, volume este que permaneceu em agitação para a retirada de uma alíquota de 200 µL para a contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Foi considerada uma repetição os esporos removidos de bagas com sintomas da doença em uma bandeja. Os resultados foram expressos em porcentagem com base na inibição da esporulação.

2.3.6 Efeito da aplicação de fosfito de potássio sobre a qualidade físico-química de cachos de uva ´Itália´

No laboratório, os cachos foram submetidos à uma toalete, para retirada de bagas injuriadas ou com podridão. Em seguida, foram realizados os tratamentos com aspersão de água, no controle, e de 10 mL L^{-1} de Phytogard®, concentração que proporcionou a maior redução na intensidade das doenças neste trabalho. Após a secagem, os frutos foram acondicionados em sacos plásticos perfurados, para

evitar a formação de uma câmara úmida e, simultaneamente, auxiliar na preservação dos frutos, os quais são apropriados para uvas de mesa. O período de armazenamento foi de oito dias, sendo realizada uma caracterização dos frutos no dia zero, e duas avaliações, aos quatro e oito dias, nas condições de 25 ºC e 85% de umidade relativa.

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada cacho considerado uma repetição.

As análises realizadas foram:

Perda de massa: determinada pela diferença de massa entre o dia zero e o dia da avaliação, em porcentagem.

Degrana: definida pela massa de bagas soltas, comparada a massa do cacho inteiro, em porcentagem, de acordo com a fórmula:

Degrana (%) = (peso de bagas soltas / peso total do cacho) * 100

Porcentagem de podridão: determinada pela pesagem de bagas com sintomas de podridão em função da massa do cacho inteiro, pela seguinte equação:

Podridão (%) = (peso de bagas com podridão / peso total do cacho) * 100

Cor da ráquis: avaliada com o auxílio de uma escala de notas (HARVEY et al. 1988), na qual 1 = verde, fresca, túrgida, 2 = verde opaca, 3 = verde para marrom clara, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seca.

Firmeza: através de um penetrômetro digital pela utilização de um *probe* de 6 mm à 2 m s^{-1}, sendo avaliadas seis bagas.

Cor: através de um colorímetro no sistema *L* a* b**,onde L* representa luminosidade (0 = preto e 100 = branco), a* e b* cromaticidade (a- = verde e a+ = vermelho e, b- = azul a b+ = amarelo), obtendo-se a média da cor de duas bagas da região superior, duas da mediana e duas da inferior, realizadas em cada cacho. O equipamento fornece os parâmetros ângulo da cor (º*H*) e Chroma ($\sqrt{a^2 + b^2}$) automaticamente.

Sólidos solúveis: com auxílio de um refratômetro digital, cuja escala varia de 0 a 32 ºBrix, obtida de doze bagas do cacho, sendo quatro da parte superior, quatro da mediana e quatro da inferior.

pH: pela medição direta em pHmetro do suco extraído das bagas e dilúido na proporção de 10g de suco para 100 mL de água (CARVALHO et al., 2002).

Acidez titulável: através da titulação com NaOH (0,1 N) do suco diluído até que fosse atingido pH = 8,1. O resultado foi expresso em g de ácido tartárico 100 mg de suco^{-1} (CARVALHO et al., 2002).

***Ratio*:** determinada pela razão entre o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável.

2.3.7 Análise estatística

Com exceção do ensaio para a avaliação de efeito do produto na qualidade físico-química dos frutos, todos os ensaios foram realizados duas vezes, sendo reunidos os dados dos dois experimentos para análises estatísticas. Nas análises de regressão foram observados o coeficiente de determinação e a significância da análise de regressão. Para os dados qualitativos, foram realizados testes para verificação da homogeneidade de variância e da normalidade dos dados, sendo realizadas transformações de dados quando necessário.

2.4 Resultados

2.4 1 Teste de patogenicidade

Após o período em câmara úmida, foi possível verificar os primeiros sintomas das doenças nas bagas. Após 2 e 3 dias para *R. stolonifer* e *B. cinerea*, respectivamente, foi possível a observação de sinais dos patógenos (Figura 2). Isto demonstra que os isolados obtidos de frutos de pêssego e morango são capazes de infectar bagas de uva.

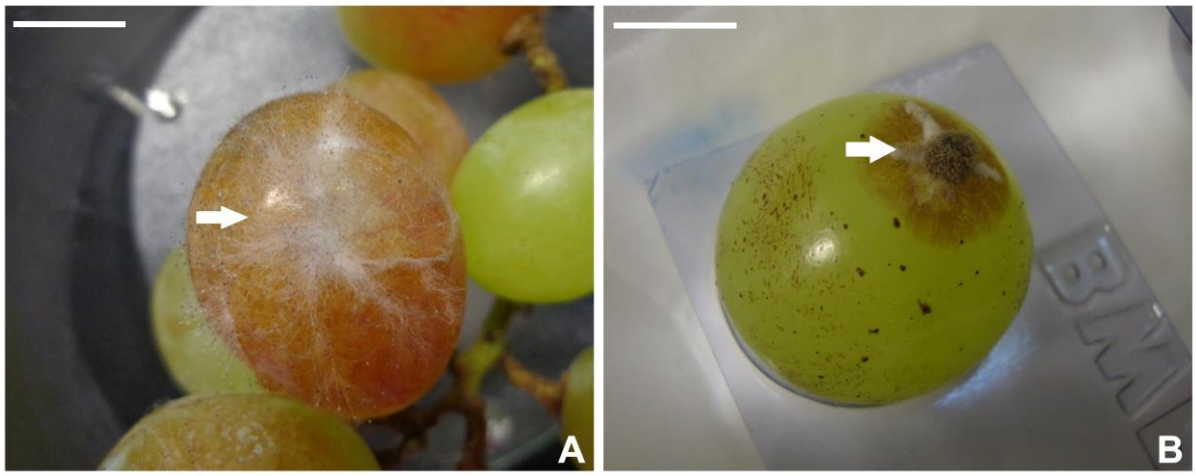


Figura 2 - Sinais de *Rhizopus stolonifer* (A) e *Botrytis cinerea* (B) após 2 e 3 dias, respectivamente, sobre bagas de uva 'Itália'. As setas indicam os sinais do patógeno *R. stolonifer* (A) e *B. cinerea* (B). Barras = 1 cm

2.4.2 Efeito do fosfito de potássio sobre o desenvolvimento *in vitro* de *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides*

2.4.2.1 Efeito sobre o crescimento micelial e a esporulação *in vitro*

Foi possível observar expressiva redução no crescimento micelial dos patógenos *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides* em concentrações crescentes de fosfito de potássio em meio de cultivo (Apêndices 1, 2 e 3). Na concentração de 10 mL L^{-1}, a inibição foi cerca de 95% (Figura 3) para *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides*, enquanto que, para *B. cinerea*, a inibição foi de 30%.

Após o término do experimento, os discos de micélio transferidos para placas contendo apenas BDA desenvolveram-se normalmente.

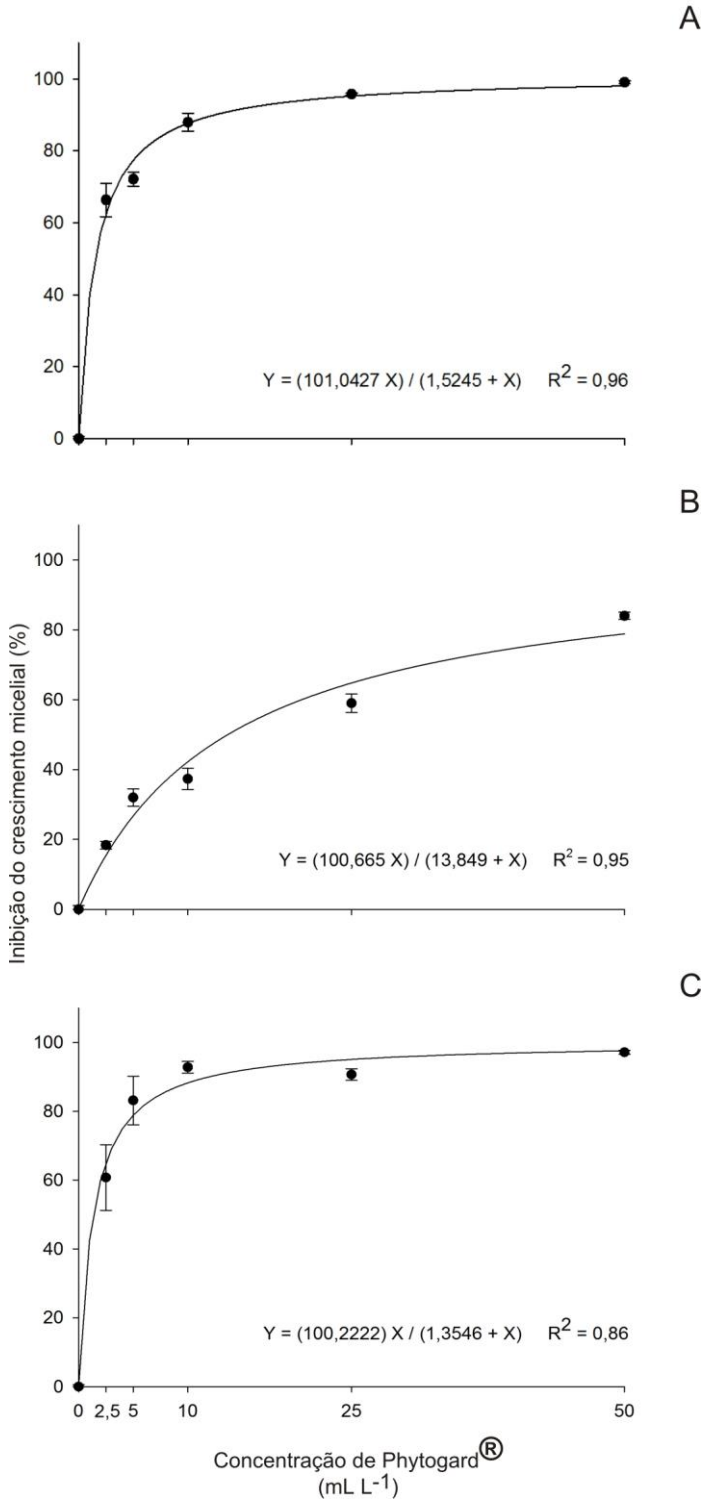


Figura 3 - Inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* (A), *Botrytis cinerea* (B) e *Colletotrichum gloeosporioides* (C) após 1, 3 e 10 dias, respectivamente, em diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%). As barras representam o erro padrão da média (n = 8)

Também foi verificado o efeito do fosfito na inibição da esporulação dos patógenos. Observa-se que na concentração de 10 mL L^{-1} a esporulação é inibida em aproximadamente 100% para os fungos *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides*,

enquanto que, para *B. cinerea* não foi observada a esporulação do patógeno durante o experimento (Tabela 3).

Tabela 3 - Inibição da esporulação de *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* após 1, 3 e 10 dias, respectivamente, em diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%)

Concentração de Phytogard® (mL L^{-1})	Inibição da esporulação (%)		
	R. stolonifer[1]	*B. cinerea*	*C. gloeosporioides*[2]
0	0 ± 44,09	-	0 ± 36,24
2,5	99,01 ± 2.79	-	100 ± 0,00
5	100 ± 0.00	-	99,98 ± 0,06
10	100 ± 0.00	-	99,97 ± 0,06
25	100 ± 0.00	-	99,95 ± 0,10
50	100 ± 0.00	-	99,96 ± 0,12

[1]Equação de regressão para *R. stolonifer* $Y = (100,002)\ (1 - 10^{(1,845\ X)})$ $R^2 = 0,76$
(-) = Não houve esporulação
[2]Equação de regressão para *C. gloeosporioides*: $Y = (99,971)\ (1 - 10^{(-9,908\ X)})$ $R^2 = 0,88$

O cálculo da concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial e da esporulação evidenciou diferentes comportamentos das espécies estudadas quanto à sensibilidade ao fosfito de potássio (Tabela 4). Quanto ao crescimento micelial e esporulação, observa-se que os isolados de *C. gloeosporioides* e *R. stolonifer* são mais sensíveis a fosfito de potássio comparando-se com o isolado de *B. cinerea*, que apresentou-se dez vezes mais resistente ao ingrediente ativo quanto ao crescimento micelial. Já para a esporulação, exceto para *B. cinerea,* observa-se maior sensibilidade dos patógenos ao fosfito, sendo esta maior para *C. gloeosporioides*.

Tabela 4 - Concentração efetiva para inibição de 50% (CE_{50}) do crescimento micelial e esporulação de *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* por Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) *in vitro*

Patógeno	CE_{50} (mL L^{-1})*	
	Crescimento micelial	Esporulação
R. stolonifer	1,49	0,89
B. cinerea	13,67	-
C. gloeosporioides	1,35	0,16

*Concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial e esporulação calculadas à partir de regressão ajustada aos dados
**Dados obtidos aos 1, 3 e 10 dias de incubação para *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, respectivamente
(-) = Não houve esporulação do patógeno durante o período de duração do ensaio

2.4.2.2 Efeito sobre a germinação dos esporos

Na Figura 4 é apresentada a inibição da germinação dos esporos de *R. stolonifer, B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Conforme observado no ensaio para

avaliação do efeito do fosfito sobre o crescimento micelial dos patógenos, concentrações crescentes de fosfito de potássio resultaram em acréscimos na inibição da germinação dos esporos, sendo que, à partir de 25 mL L^{-1}, a inibição da germinação tendeu a 100%, em média.

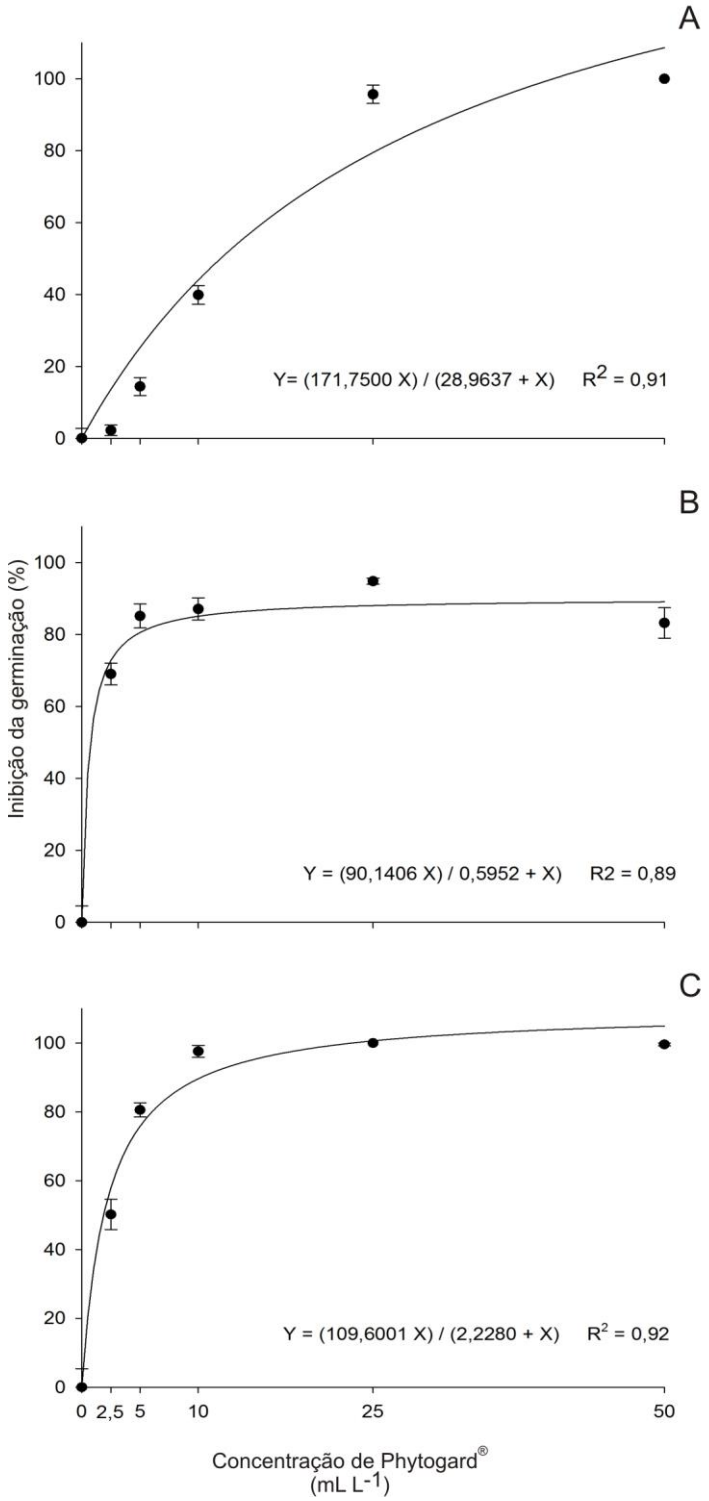


Figura 4 - Inibição da germinação de *Rhizopus stolonifer* (A), *Botrytis cinerea* (B) e *Colletotrichum gloeosporioides* (C) após 8, 24 e 16 horas, respectivamente, em diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%). As barras representam o erro padrão da média (n = 20)

2.4.3 Uso de fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva ‘Itália’ individualizadas

2.4.3.1 Teste preliminar de inoculação de *R. stolonifer* em bagas de uva ‘Itália’ individualizadas

Na Figura 5 observa-se o desenvolvimento da doença durante quatro dias nos métodos de inoculação utilizados neste ensaio. Verifica-se que a incidência da podridão mole foi maior quando a solução nutritiva foi utilizada na preparação do inóculo tanto em bagas feridas e não feridas. Ainda, no tratamento em que a suspensão de esporos foi preparada em água e sem realização de ferimento, a incidência da doença foi nula.

Desta forma, na busca de um método que mimetize o que ocorre na cadeia produtiva, nos ensaios posteriores foram realizados ferimentos nas bagas, o que assemelha-se a possíveis ferimentos que podem ocorrer nos frutos. Ainda, a preparação da suspensão de esporos foi realizada em água, para comparação com gotículas de água que possam estar presentes nas embalagens nas quais os cachos de uva são embalados no mercado.

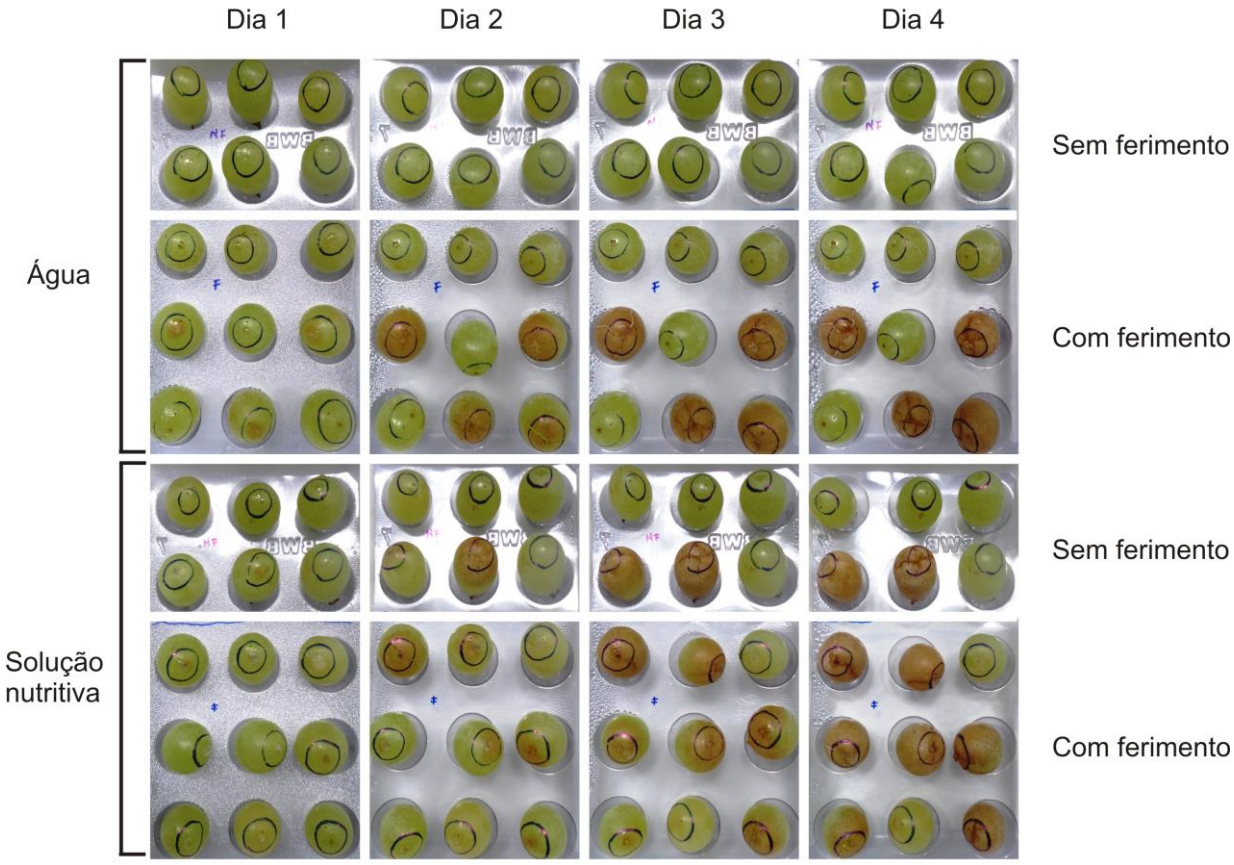


Figura 5 - Evolução dos sintomas da podridão mole em bagas de uva ´Itália´ durante quatro dias com e sem ferimento inoculadas com suspensão de esporos de *Rhizopus stolonifer* em água ou em solução nutritiva. Bagas verdes foram consideradas sadias enquanto que bagas com pequenas lesões que evoluiram e colonizaram toda a baga, foram consideradas doentes

2.4.3.2 Avaliação do efeito protetor de fosfito de potássio

Na Figura 6 são apresentados a incidência da podridão mole, do mofo cinzento e da podridão da uva madura em bagas de uva ´Itália´ tratadas com diferentes concentrações de Phytogard® para avaliação do efeito protetor do produto. Houve redução em 10, 14 e 20% na incidência da podridão mole nas concentrações de 2,5, 5 e 10 mL L^{-1}, comparando-se com o controle (Figura 6A). Para o mofo cinzento, o decréscimo na incidência foi de 10, 16 e 28% para as concentrações de 2,5, 5 e 10 mL L^{-1}, novamente, em comparação com o tratamento controle (Figura 6B). Quanto à podridão da uva madura, a redução na incidência observada foi de 6, 11 e 28% para as concentrações crescentes de fosfito de potássio estudadas (Figura 6C).

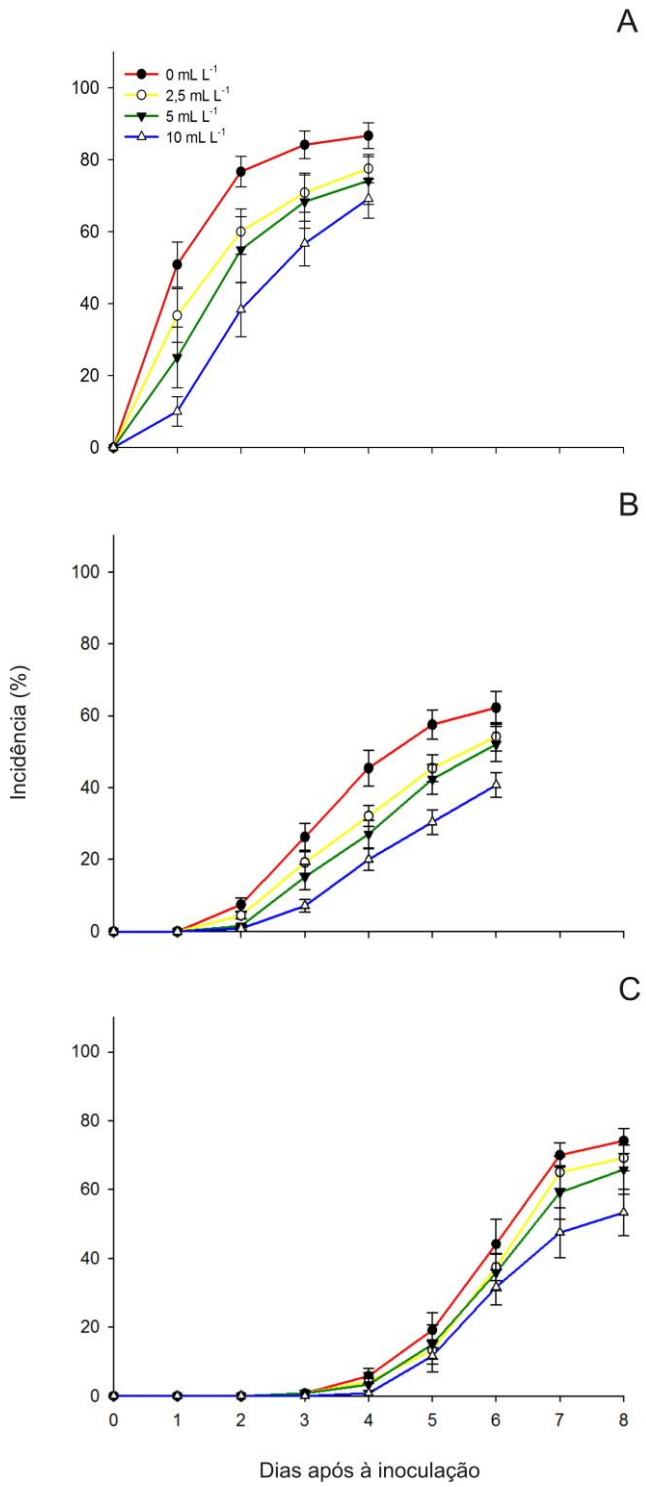


Figura 6 - Incidência da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) (A), mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (B) e podridão da uva madura (*Colletotrichum gloeosporioides*) (C), em bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) nas doses de 0, 2,5, 5 e 10 mL L-1 para avaliação do efeito protetor do produto. A inoculação foi realizada 16 horas após a aspersão do produto. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com doze bagas. As barras correspondem ao erro padrão da média

Houve diferença significativa quanto à área abaixo da curva de progresso da incidência e do índice de severidade das doenças em doses crescentes de fosfito de

potássio no tratamento protetor ($p < 0,05$). A concentração de 10 mL L^{-1} proporcionou maior redução na incidência e no índice de severidade para as três doenças, sendo que os maiores valores encontrados foram para o mofo cinzento (Figura 7).

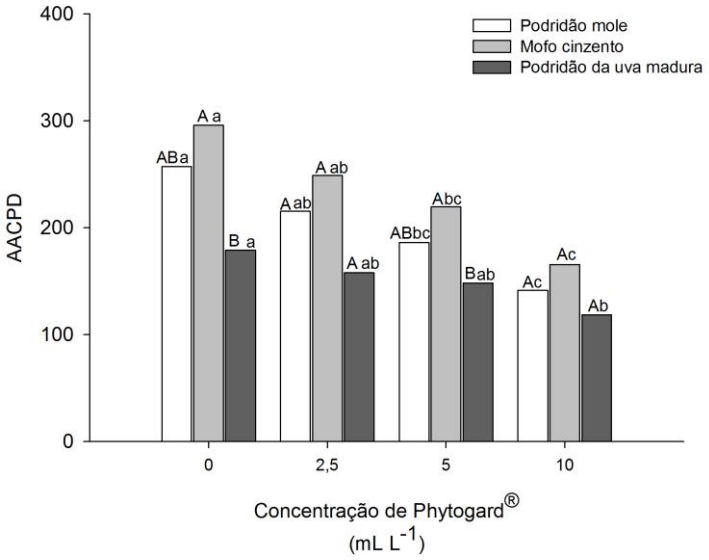


Figura 7 - Área abaixo da curva de progresso da incidência das doenças podridão mole, mofo cinzento e podridão da uva madura, causadas por *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides*, durante 4, 6 e 8 dias, respectivamente, em bagas de uva ´Itália´ individualizadas e tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) nas doses de 0, 2,5, 5 e 10 mL L-1 para avaliação do efeito protetor do produto. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com doze bagas. Barras de uma mesma cor, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade

A evolução dos sintomas da podridão mole, do mofo cinzento e da podridão da uva madura é apresentada nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente. Observa-se que à partir do terceiro dia após a inoculação para podridão mole, do quarto dia para o mofo cinzento e do sétimo dia para a podridão da uva madura, foi possível a diferenciação entre os tratamentos, ou seja, concentrações crescentes de fosfito de potássio proporcionaram redução na incidência das doenças.

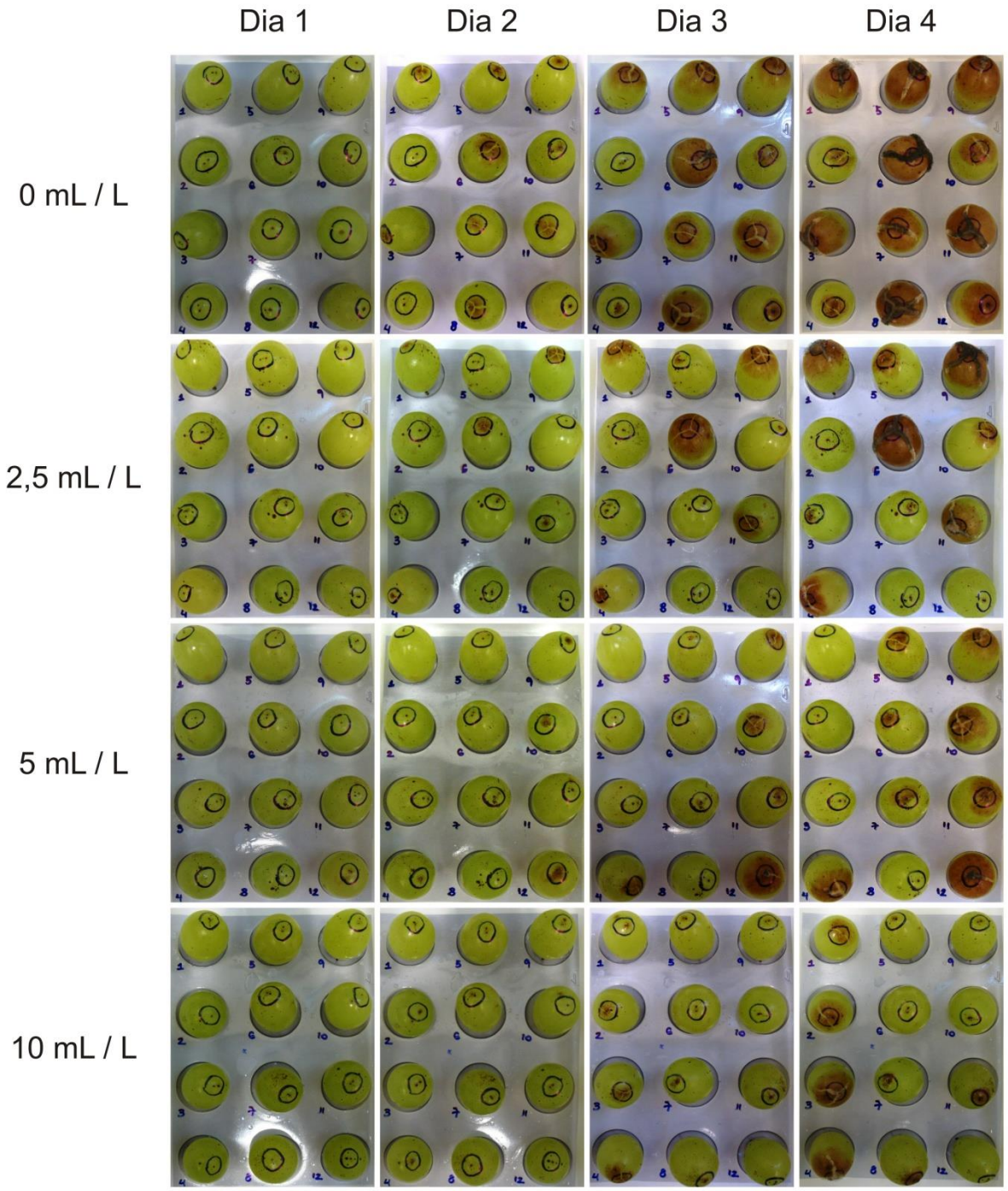


Figura 8 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito protetor de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%), aplicado por aspersão 16 horas antes da inoculação do patógeno nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1}, no controle da podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer* durante quatro dias

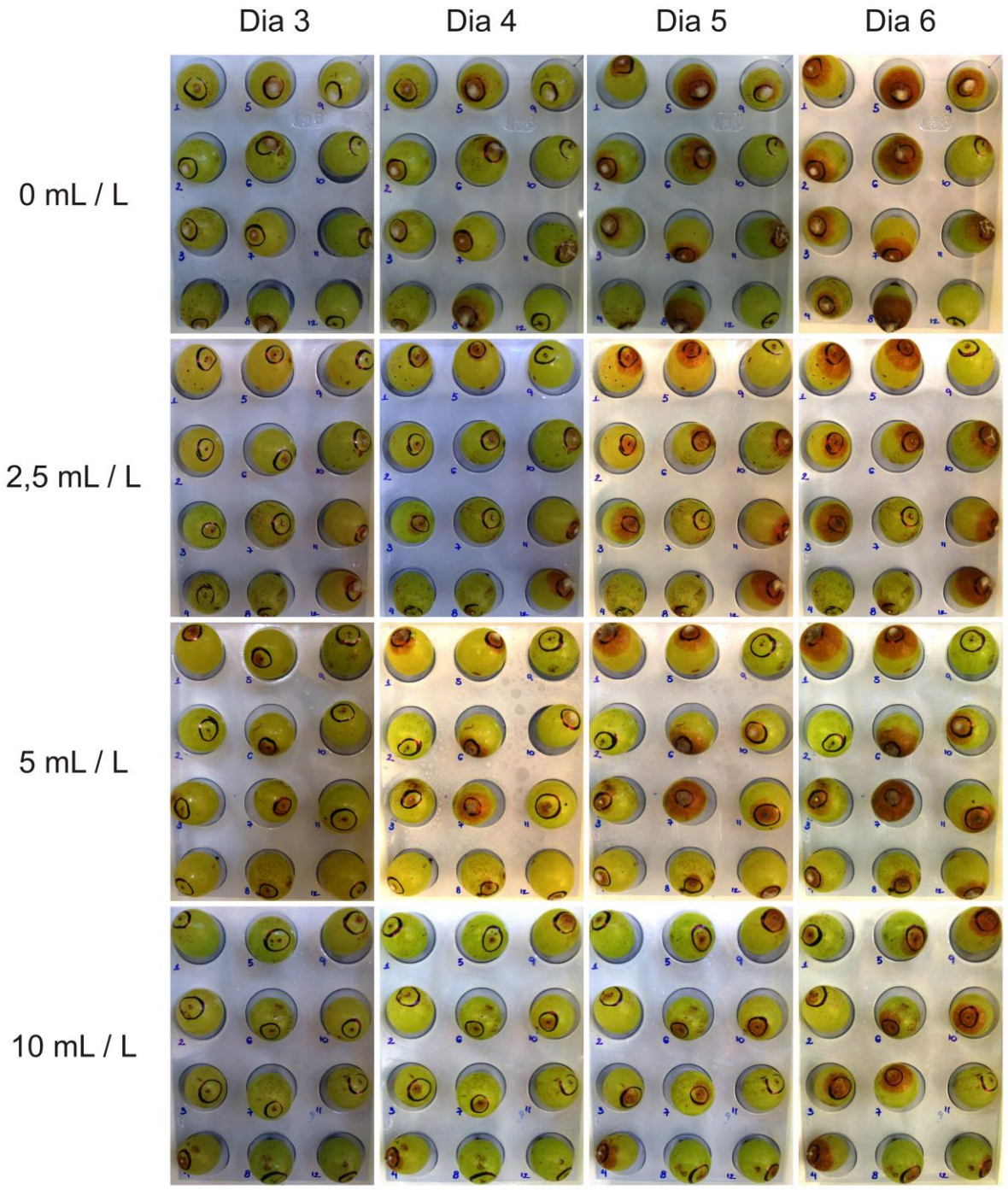


Figura 9 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito protetor de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%), aplicado por aspersão 16 horas antes da inoculação do patógeno nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1}, no controle do Mofo cinzento causada por *Botrytis cinerea* no período de 3 à 6 dias após a inoculação

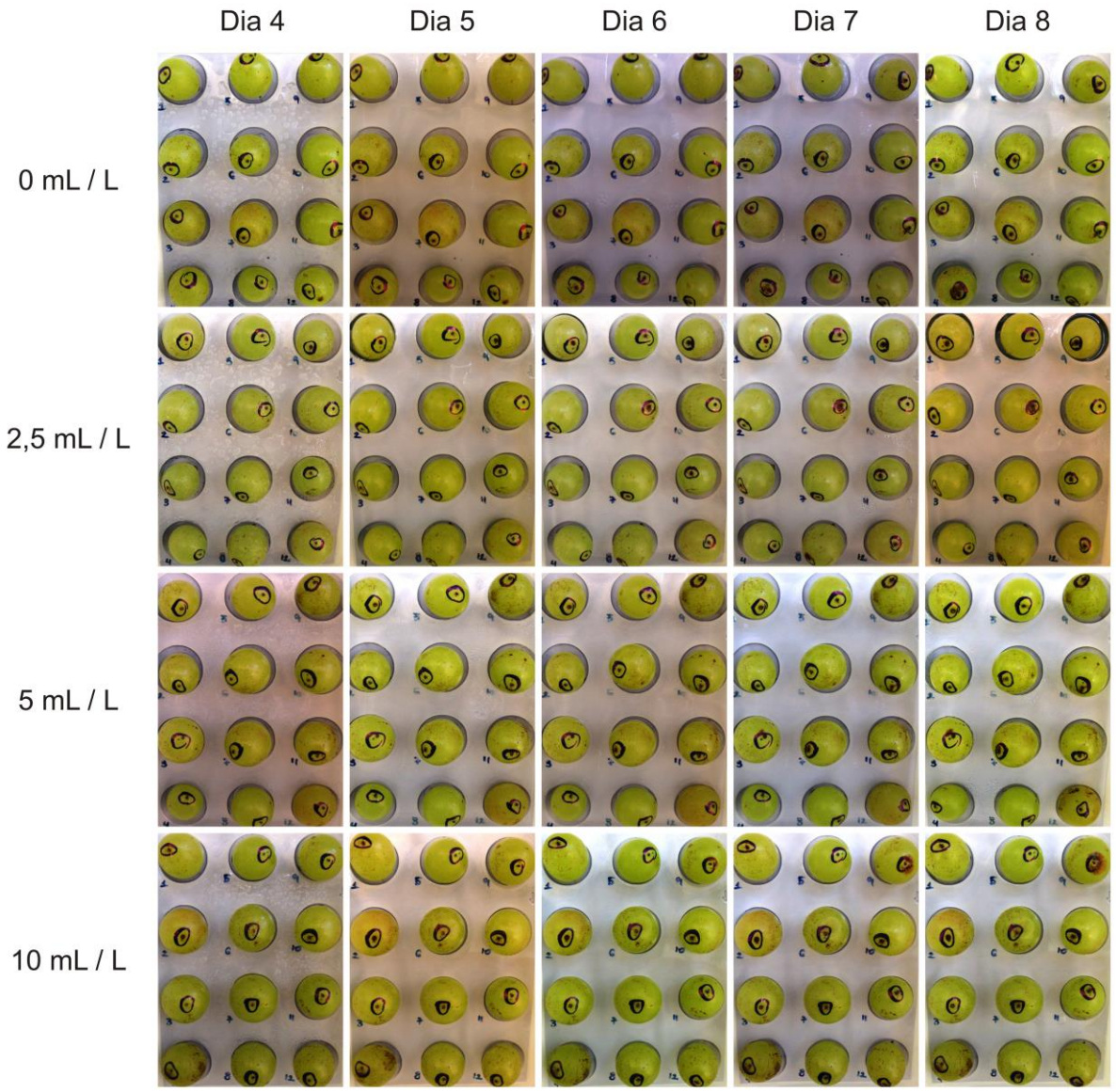


Figura 10 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito protetor de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL $^{-1}$, no controle da podridão da uva madura causada por *Colletotrichum gloeosporioides* no período de quatro a oito dias após a inoculação

Ainda, conforme observado nos ensaios *in vitro*, houve redução na esporulação dos patógenos em tratamentos com concentrações crescentes de fosfito, o que pode ser visualizado na Figura 11.

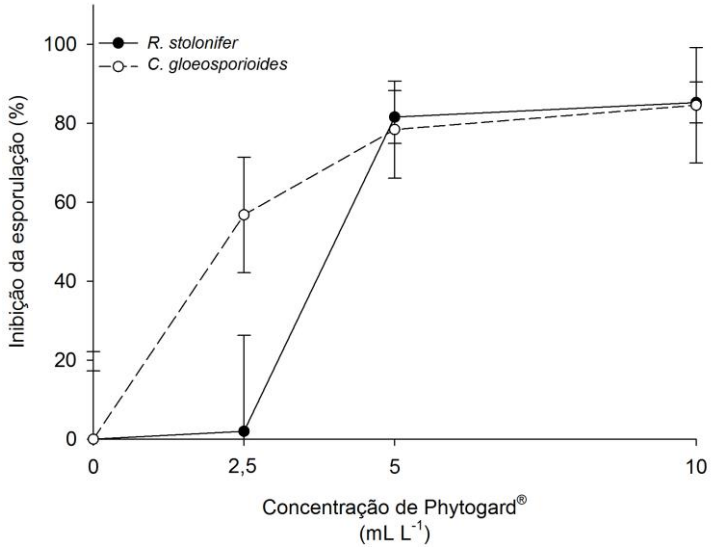


Figura 11 - Inibição da esporulação de *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides* após 4 e 8 dias, respectivamente, em bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} para avaliação do efeito protetor do produto. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com doze bagas. As barras indicam o erro padrão da média

2.4.3.3 Avaliação do efeito curativo de fosfito de potássio

Observa-se na Figura 12 a incidência das doenças estudadas neste trabalho quanto ao efeito curativo do produto. Em comparação com o tratamento controle, os tratamentos com o fosfito de potássio comercial nas doses de 2,5, 5 e 10 mL L^{-1},com efeito curativo, proporcionaram redução de 45, 46 e 63% na incidência da podridão mole, respectivamente (Figura 12A).

Para o mofo cinzento, os tratamentos com fosfito também apresentaram redução na intensidade da doença, sendo que houve redução na incidência de 12, 10 e 22% nas concentrações crescentes de Phytogard® estudadas (Figura 12B).

Apenas para a podridão da uva madura, na avaliação do efeito curativo do fosfito, não foi verificada redução progressiva na incidência com o uso de concentrações mais altas, conforme ocorreu nos demais tratamentos. A incidência da doença foi de 25, 10 e 17% para as três concentrações utilizadas, respectivamente (Figura 12C).

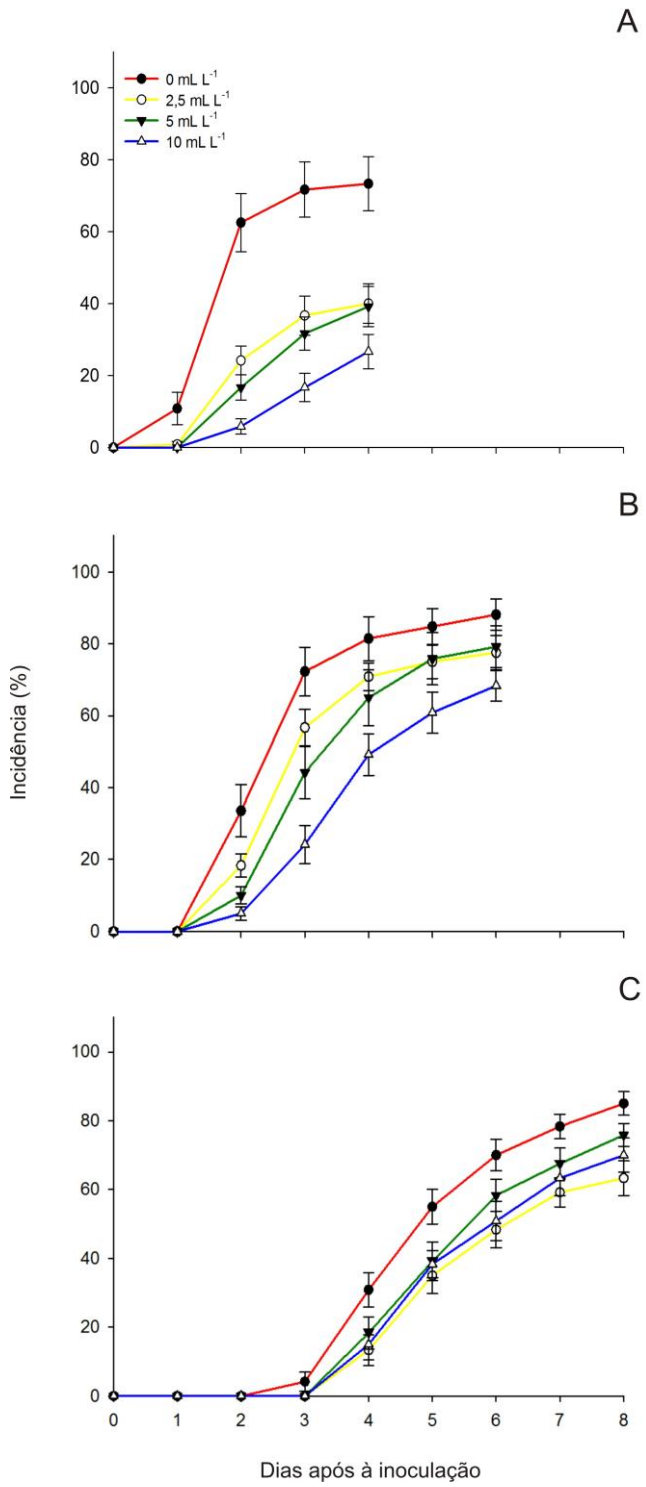


Figura 12 - Incidência da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) (A), mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) (B) e podridão da uva madura (*Colletotrichum gloeosporioides*) (C), respectivamente em bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L-1 para avaliação do efeito curativo do produto. A inoculação foi realizada 3, 4 e 4 horas antes da aspersão do produto para os patógenos *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, respectivamente. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com doze bagas. As barras correspondem ao erro padrão da média

Foi encontrada diferença significativa quanto à área abaixo da curva de progresso da podridão mole, do mofo cinzento e da podridão da uva madura ($p < 0,05$). Novamente, a concentração de 10 mL L^{-1} foi a que exibiu maior controle das doenças (Figura 13).

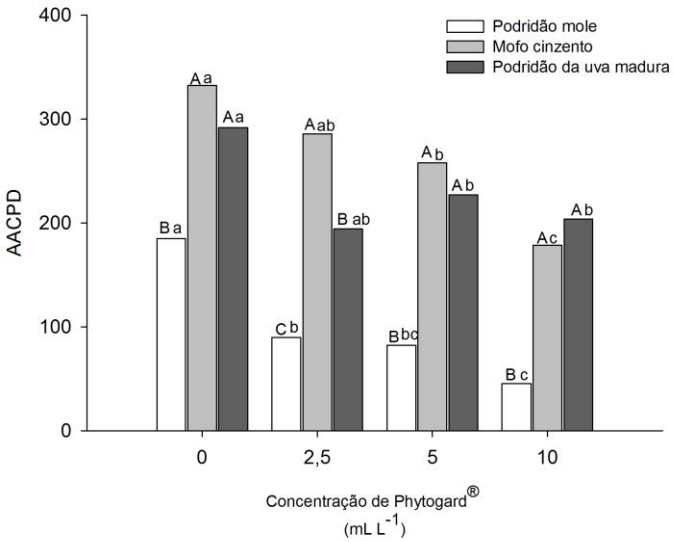


Figura 13 - Área abaixo da curva de progresso (AACPD) da incidência das doenças podridão mole, mofo cinzento e podridão da uva madura, causadas por *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletrotrichum gloeosporioides*, durante 4, 6 e 8 dias, respectivamente, em bagas de uva ´Itália´ individualizadas e tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L-1 para avaliação do efeito curativo do produto. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com doze bagas. Barras de uma mesma cor, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade

Pode-se observar a evolução dos sintomas da podridão mole e do mofo cinzento nas Figuras 14, 15 e 16, onde a diferenciação dos tratamentos foi possível a partir do terceiro dia para a podridão mole, quarto dia para o mofo cinzento e do sexto dia, para a podridão da uva madura após a inoculação.

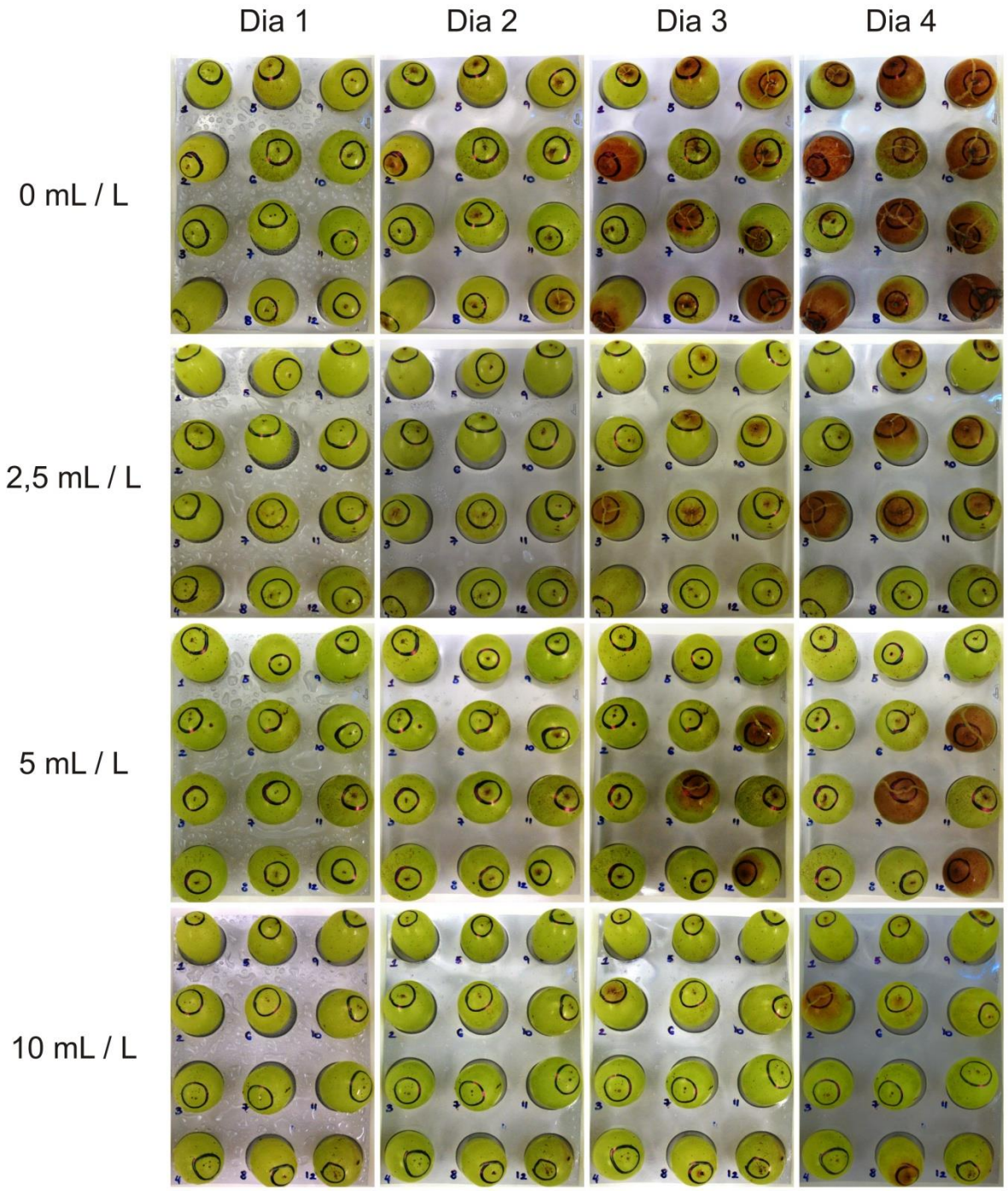


Figura 14 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito curativo de Phytogard (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão quatro horas após a inoculação do patógeno nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} no controle da podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer* durante quatro dias

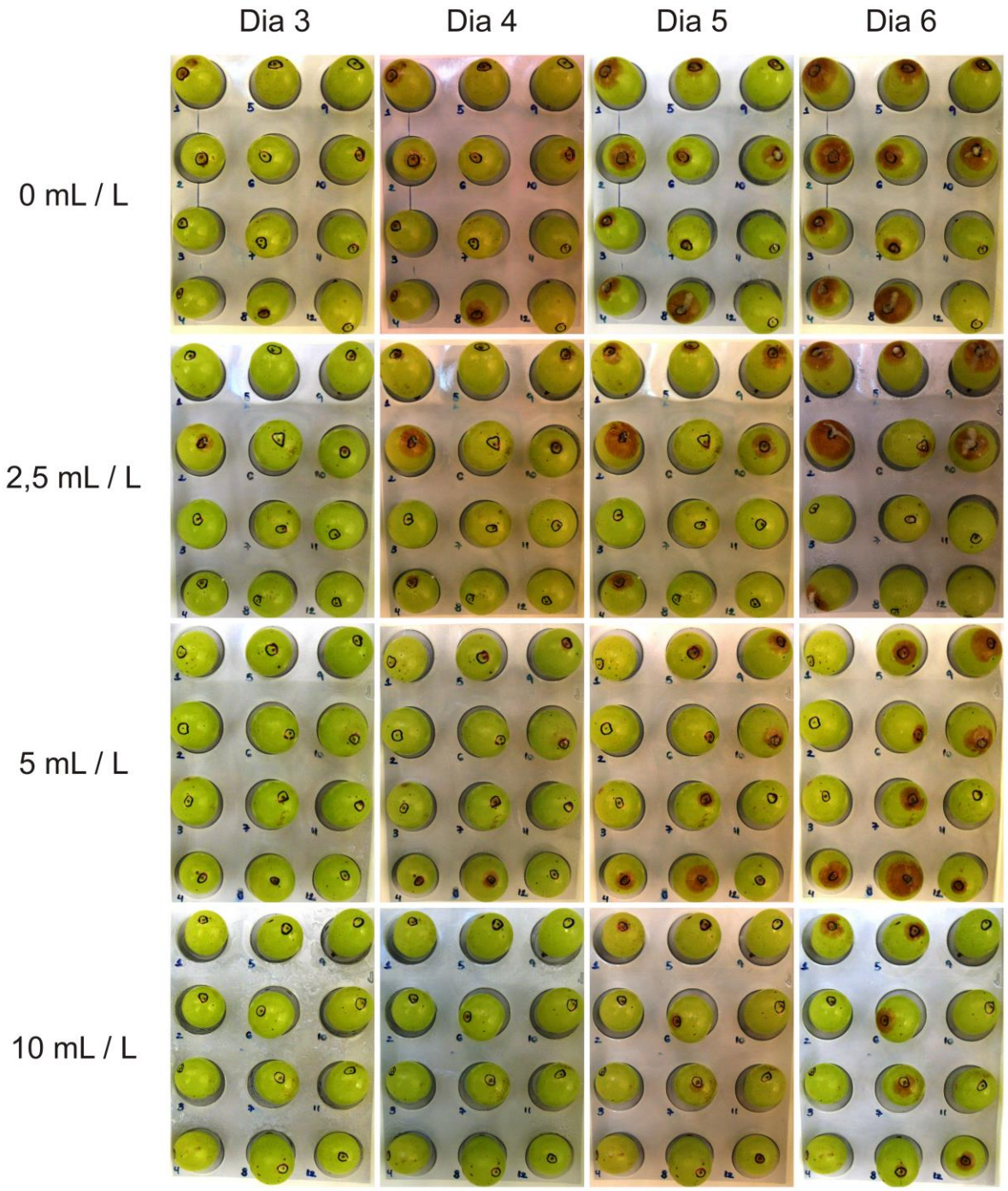


Figura 15 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito curativo de Phytogard (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão quatro horas após a inoculação do patógeno nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} no controle do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* no período de quatro a seis dias dias após a inoculação

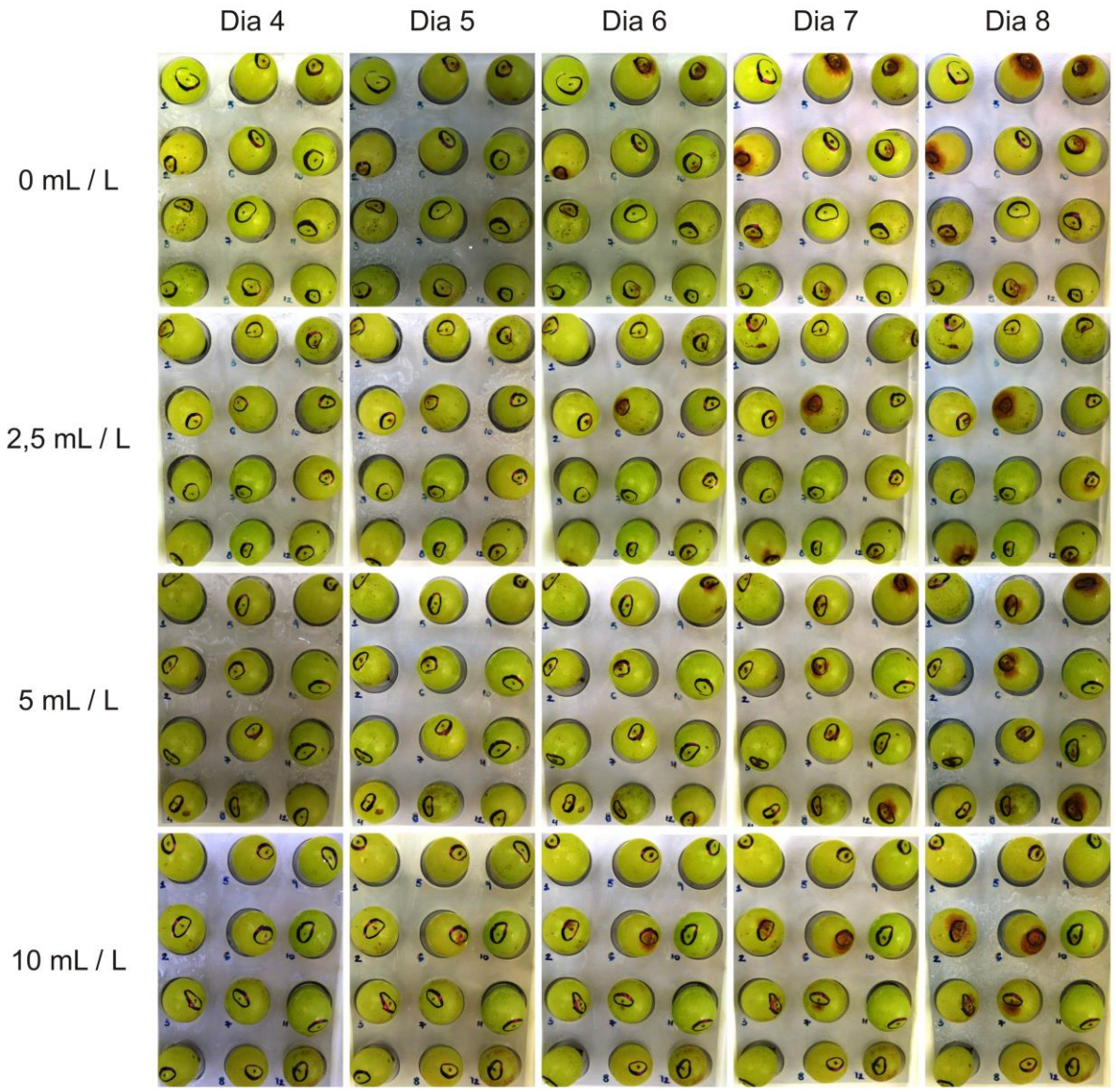


Figura 16 - Ilustração de um experimento para avaliação do efeito protetor de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL $^{-1}$, no controle da podridão da uva madura causada por *Colletotrichum gloeosporioides* no período de quatro à oito dias após a inoculação

Da mesma forma que na avaliação do efeito protetor, a aplicação de fosfito proporcionou redução na esporulação do patógeno na superfície dos frutos mediante tratamento curativo (Figura 17).

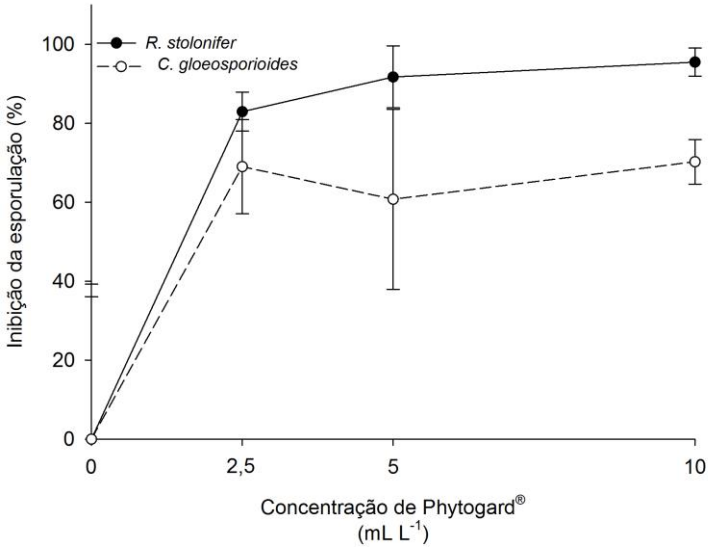


Figura 17 - Inibição da esporulação de *Rhizopus stolonifer* e *Colletotrichum gloeosporioides* após 4 e 8 dias, respectivamente, em bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} para avaliação do efeito curativo do produto. As barras indicam o erro padrão da média

2.4.4 Efeito da aplicação de fosfito de potássio sobre a qualidade físico-química de cachos de uva ´Itália´

Em geral, não houve influência da aplicação do fosfito de potássio na qualidade físico-química dos cachos de uva durante 8 dias, comparando-se com o controle. Apesar da expressiva diferença entre os cachos tratados ou não com fosfito no oitavo dia (Figura 18), devido à ocorrência de podridão natural, esta não se reflete nas demais variáveis analisadas, visto que as bagas apodrecidas ou degranadas não são utilizadas para determinação dos demais parâmetros.

Figura 18 - Aparência dos cachos de uva ´Itália´ após 8 dias do tratamento com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0 (B) e 10 mL L^{-1} (A) e mantidos em câmara climatizada à 25 °C e 80% de umidade relativa. Barra = 2 cm

A determinação dos parâmetros luminosidade (*ºL*), cromaticidade (*Chroma*) e ângulo da cor (*ºH)* aponta aspectos relacionados à cor das bagas. Foram observadas discretas alterações na luminosidade e na cromaticidade porém, houve diferença significativa apenas para o ângulo da cor (*ºH)* no quarto dia após a aplicação do produto ($p < 0,05$), o que não representou alterações significativas, na prática (Figura 19).

Parâmetros como perda de massa, degrana, podridão, firmeza e aparência da ráquis não foram afetados pelo tratamento com fosfito, entretanto foi observada discreta preservação da qualidade nos cachos tratados, em comparação com o controle (Figura 20). Foi observada redução de degrana e da incidência de podridões naturais em uvas tratadas com fosfito, principalmente no oitavo dia de avaliação. Entretanto, estas alterações não proporcionaram diferença significativa.

O teor de sólidos solúveis, acidez titulável e *ratio* não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos nos períodos avaliados. O pH determinado das bagas de cachos de uva apresentou variação entre 3,48 e 3,77 durante o período de armazenamento para ambos os tratamentos testados. Apesar da diferença significativa encontrada, é possível afirmar que, esta alteração é irrelevante na prática (Figura 21).

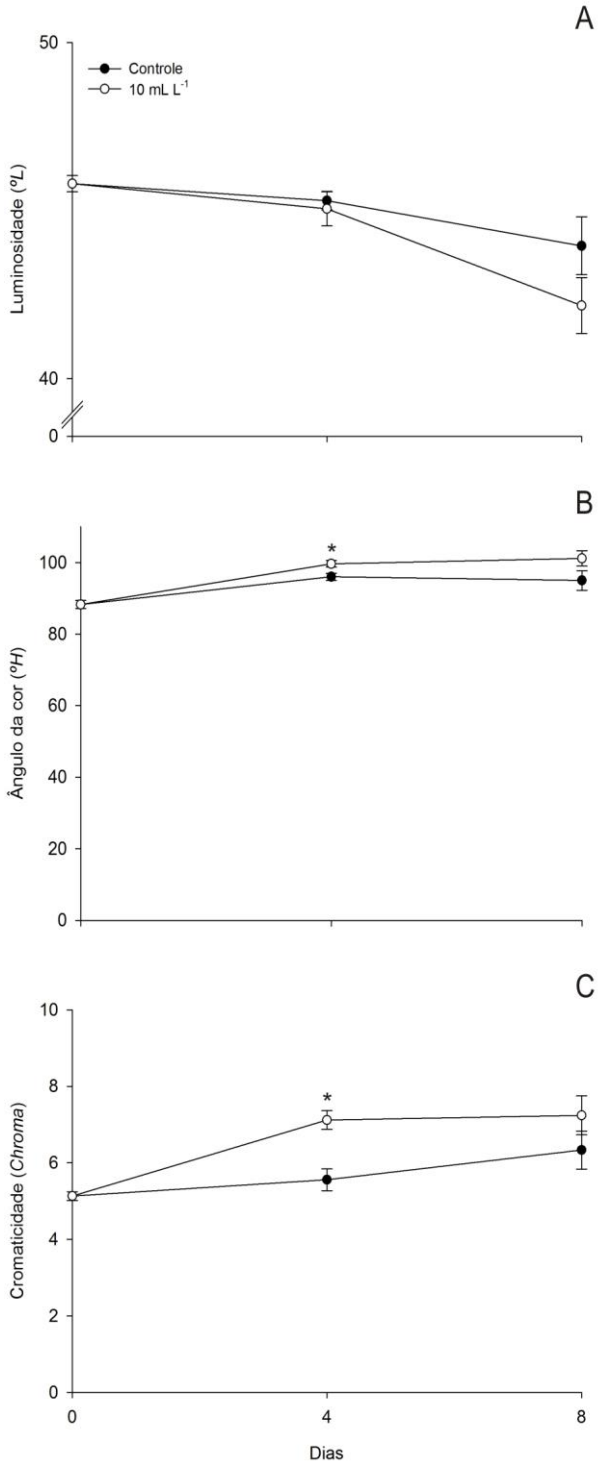


Figura 19 - Determinação da cor da casca por meio da luminosidade (A), ângulo da cor (B) e cromaticidade (C) de bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0 (controle) e 10 mL L^{-1} e armazenadas por oito dias à 25 ºC e 80% de umidade relativa. Parâmetros determinados em colorímetro, sistema L C H, onde L* representa luminosidade (0=preto a 100=branco), C representa cromaticidade e H (Hue), o ângulo de cor (0° a 360° - 0°: vermelha, 90°: amarelo, 180°: verde e 270°: azul). Média de seis repetições. *: indica que as médias diferem significativamente entre si pelo teste t de Student ($P \leq 0,05$)

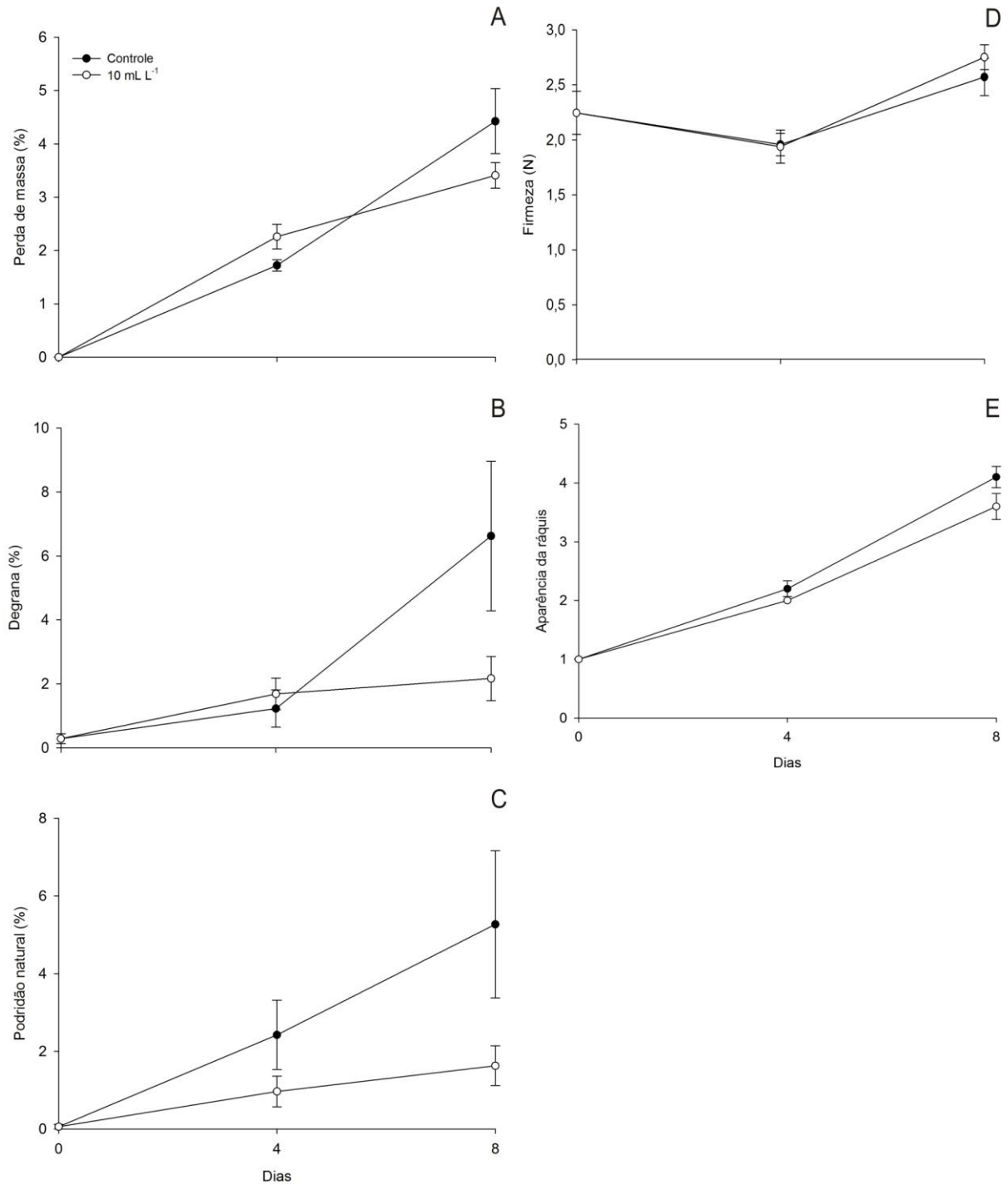


Figura 20 - Perda de massa (A), degrana (B), podridão natural (C), firmeza (D) e aparência da ráquis (E) de bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0 e 10 mL L^{-1}, armazenadas por oito dias à 25 ºC e umidade relativa de 80%. O parâmetro perda de massa foi determinado por meio da diferença de massa dos cachos entre os dias zero e o dia da avaliação. Os parâmetros degrana e podridão foram determinados pela massa de bagas degranadas e com sintomas de podridão, rspectivamente, comparando-se à massa total do cacho. A firmeza foi determinada em penetrômetro com *probe* de 6 mm. A aparência da ráquis foi avaliada com o auxílio de uma escala de notas (1 = verde, fresca, túrgida, 2 = verde opaca, 3 = verde para marrom clara, 4 = predominantemente marrom e 5 = marrom pardo e seca, de acordo com Harvey et al. 1988). Média de seis repetições

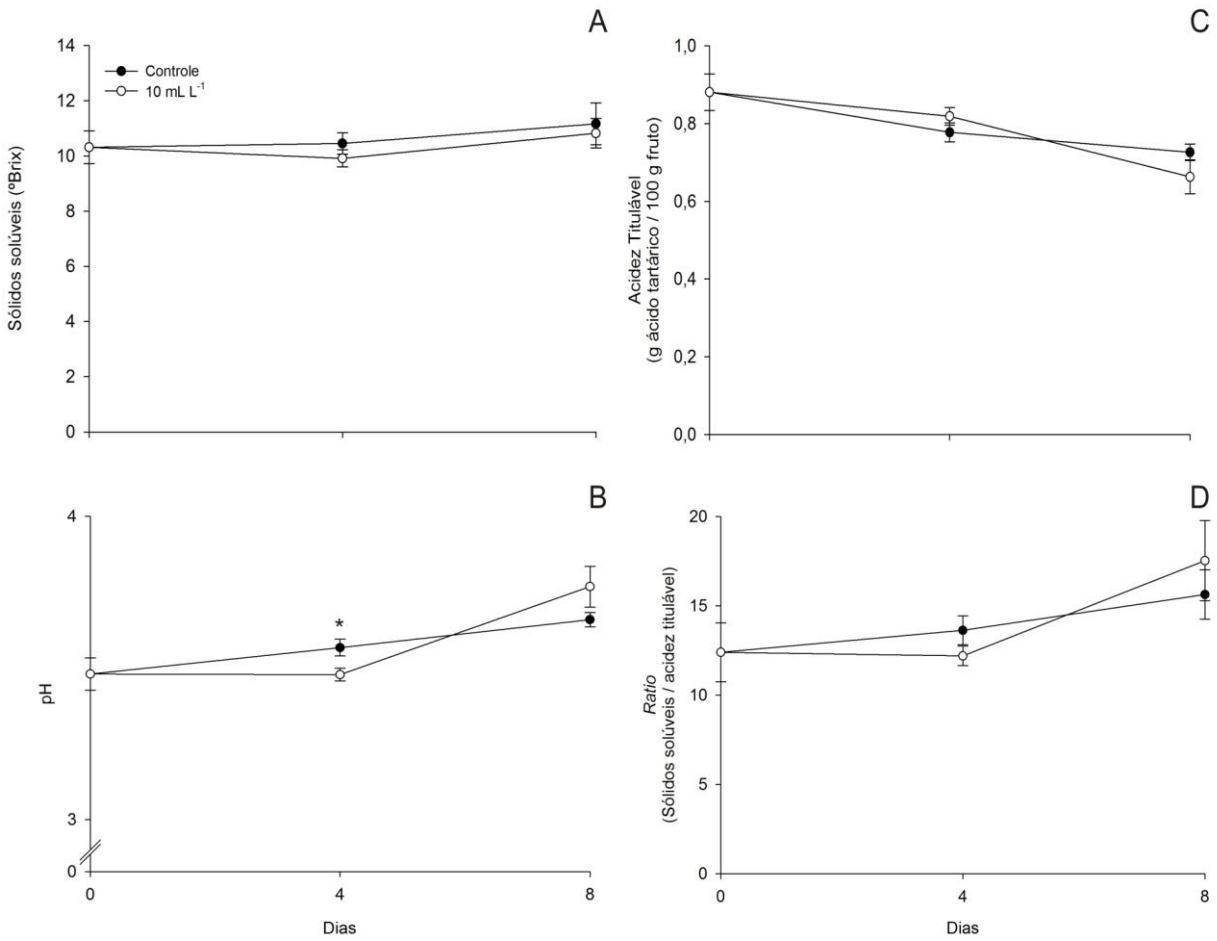


Figura 21 - Sólidos solúveis (A), pH (B), acidez titulável (C) e *ratio* (D) de bagas de uva ´Itália´ tratadas com Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) aplicado por aspersão nas concentrações de 0 e 10 mL L^{-1} armazenadas por oito dias à 25 ºC. Teor sólidos solúveis determinado em refratômetro. Média de seis repetições. *: indica que as médias diferem significativamente entre si pelo teste t de Student ($P \leq 0,05$)

2.5 Discussão

A ocorrência de doenças é o principal problema pós-colheita, a qual leva à grandes perdas econômicas. Devido à atual exigência na redução nas aplicações de agrotóxicos e dos seus resíduos, a necessidade por produtos alternativos tornou-se recorrente (CASTILLO et al., 2010). Relatos sobre o uso de fosfitos no controle de doenças pós-colheita ainda são recentes (AMIRI; BOMPEIX, 2011; REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003; CERIONI et al. 2013a; b; BLUM et al. 2007; MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009), entretanto, o uso deste produto em uvas ainda não havia sido descrito.

Foi observado neste trabalho o potencial do fosfito de potássio para controle de doenças pós-colheita em uvas de mesa. O produto apresentou atividade *in vitro* contra *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, proporcionando inibição do

crescimento micelial, da esporulação e da germinação dos três patógenos. Fenn e Coffey (1984) utilizaram ácido fosforoso e observaram controle *in vitro* de diversas espécies de *Phytophthora* e de patógenos como *Alternaria alternata, Rhizoctonia solani, Thielaviopsis basicola, Phomopsis viticola, Neurospora tetrasperma* e *Colletotrichum phonioides*. A inibição do crescimento micelial e/ou da germinação de *Penicillium expansum* (AMIRI; BOMPEIX, 2011; CERIONI et al. 2013a), *A. alternata* (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003) também foi observada na presença de fosfito de potássio. Ainda, conforme observado neste estudo, o fosfito de potássio exibiu efeito fungistático à agentes patogênicos à batateira, como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Streptomyces scabies* (LOBATO et al. 2010). Mills, Plat e Hurta (2004) observaram a redução na esporulação de diversos patógenos em batateira na presença de sais orgânicos e inorgânicos, como sorbato de potássio, bicarbonato de sódio, sulfato de cobre, dentre outros. A elevada resistência de *B. cinerea* contra fosfito de potássio observada neste trabalho, comparada com os outros patógenos testados, pode ser explicada pelo alto risco de desenvolvimento de resistência, visto há diversos relatos que comprovam este fenômeno (RUSSELL, 2003; BRENT; HOLLOMON, 2007). O risco de resistência depende tanto do patógeno quanto do produto a ser utilizado como, fungicida de sítio único de ação no microrganismo, resistência cruzada e patógeno de rápido desenvolvimento, dentre outras características (RUSSELL, 2003; BRENT; HOLLOMON, 2007).

O efeito de sais inorgânicos como fosfito de potássio, bicarbonato de sódio e sorbato de potássio, dentre outros produto utilizados na indústria alimentícia, tem sido reconhecido na literatura como efetivos no controle de doenças pós-colheita tanto em condições de pré quanto em pós-infecção (FELIZIANI et al. 2013; ROMANAZZI et al. 2012; REBOLLAR-ALVITER et al. 2010; AMIRI; BOMPEIX, 2011; REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003, CERIONI et al. 2013a; b; BLUM et al. 2007; MONOSCO-RAMÍREZ; MONTESINOS-HERRERO; PALOU, 2013; MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009; YOUSSEF; ROBERTO, 2014).

Dependendo da velocidade de desenvolvimento da doença e do momento da aplicação, a eficiência do produto pode variar, tanto em tratamentos protetor quanto curativo. Neste estudo, a aplicação de fosfito de potássio levou à significativas reduções na ocorrência das três doenças, com ênfase na dose de 10 mL L^{-1}. O tratamento curativo foi mais eficiente no controle da podridão mole, enquanto que, para o mofo cinzento, o efeito dos tratamentos curativo e protetor foi semelhante.

Para a podridão da uva madura, a redução na ocorrência da doença foi menor em ambos os tratamentos protetor e curativo, comparando-se com as outras doenças estudadas.

Blum et al. (2007) obtiveram controle do mofo azul em maçãs com aplicação pós-colheita de fosfito de potássio semelhante ao tratamento realizado com benomil, o qual se encontra indisponível no mercado atualmente. O emprego do tratamento curativo com fosfito isoladamente proporcionou controle dos mofos verde e azul em frutos cítricos (CERIONI et al. 2013a) e da podridão de *Alternaria* em maçãs (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003). A aplicação do produto em conjunto com um método físico, como a imersão dos frutos em água quente contendo fosfito, apresentou controle de diversas doenças pós-colheita causadas por *Penicillium digitatum* e *P. italicum*, *Phytophthora palmivora* e *P. nicotianae*, *Diaporthe citri*¸ *Geotrichum citri-aurantii* e *Lasiodiplodia theobromae* em limões ´Eureka´ (CERIONI et al. 2013b) e maçãs (AMIRI; BOMPEIX, 2011). Usall et al. (2008) utilizaram sais inorgânicos no controle do mofo verde em laranjas ´Valência´ e observaram maior efeito curativo do que protetor, semelhantemente ao encontrado neste estudo para a podridão mole.

Alguns sais inorgânicos utilizados na indústria alimentícia, chamados “geralmente reconhecidos seguros” (do inglês *“generally recognized as safe”* – GRAS) pela FAO (Food and Agriculture Organization, Estados Unidos), tem sido estudados no controle de doenças pós-colheita como alternativa de baixos custo e toxicidade à humanos. Dentre eles, encontra-se o bicarbonato de sódio, sorbato de potássio, bicarbonato de potássio, silicato de cálcio e metilparabeno de sódio, dentre outros (FAO, 2013c). Youssef e Roberto (2014) conseguiram resultados promissores na aplicação protetora de diversos sais de potássio e cálcio no controle do mofo cinzento em uvas de mesa. O desenvolvimento dos mofos azul e verde, em citros, foi totalmente inibido em resposta a aplicação de 200 mM de metilparabeno de sódio (MONOSCO-RAMÍREZ; MONTESINOS-HERRERO; PALOU, 2013). Em cerejas, a podridão parda e o mofo cinzento foram eficientemente controlados com imersão dos frutos em solução de bicarbonato de potássio (26 g L^{-1}) (FELIZIANI et al. 2013). Em uvas de mesa destacadas, diversos sais foram testados no controle do mofo cinzento, sendo que, o bicarbonato de amônio apresentou os melhores resultados (MLIKOTA GABLER; SMILANICK, 2001).

A inibição da esporulação tem sido apontada como um dos alvos dos fosfitos (DELIOPOULOS; KETTELWELL; HARE, 2010). Houve expressiva redução na esporulação de *R. stolonifer* e *C. gloeosporioides* nos ensaios com as bagas de uva em ambos os tratamentos protetor e curativo. Resultados similares foram encontrados por Monosco-Ramírez; Montesinos-Herrero; Palou, (2013) que observaram a redução da esporulação de *P. digitatum* e *P. italicum* em laranjas ´Valência´ tratadas com metilparabeno de sódio. A esporulação do patógeno no ambiente pós-colheita pode levar a contaminação de frutos sadios, o que favorece a ocorrência de podridões. Assim, produtos que proporcionam a inibição da esporulação, como o fosfito de potássio, são de grande importância no manejo pós-colheita (NJOMBOLWANA; ERASMUS; FOURIE, 2013).

Em geral, não foram observadas diferenças na qualidade físico-química das bagas tratadas com fosfito em comparação com o tratamento controle. Estes resultados corroboram com os relatos existentes em citros (CERIONI et al. 2013a), uvas de mesa (YOUSSEF; ROBERTO, 2014), pêssego (MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009) e maçã (AMIRI; BOMPEIX, 2011). Além disso, Pereira et al. (2012) observaram que cachos de uva, provenientes de áreas tratadas com fosfito de potássio, apresentaram maior massa e a produtividade também foi elevada. Há diversos problemas de aceleração da perda de qualidade em uvas de mesa durante o armazenamento como a perda de massa, amolecimento do tecido, escurecimento da ráquis e ocorrência de odor e sabor desagradáveis atribuídos ao excesso de maturação, a qual, em geral, é acompanhada pela ocorrência de patógenos, o que limita a comercialização e o consumo (CASTILLO et al. 2010; CRISOSTO et al. 2002a, b). Vale salientar, no presente trabalho, que o teor de sólidos solúveis está abaixo da recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual exige valores superiores à 14 °Brix, o que não condiz às normas brasileiras de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para Classificação da Uva Fina de Mesa (Instrução Normativa 001 de 01 de Fevereiro de 2002). Consequentemente, o baixo valor de sólidos solúveis ocasionou um *ratio* inferior à 20, o que indica que os frutos do lote analisado apresentavam sabor não agradável ao paladar.

Nas regiões produtoras de uvas de mesa na Itália e nos Estados Unidos, os cachos são embalados diretamente no campo. Esta prática é comum devido à fragilidade do produto, logística e elevação nos custos de produção (ROMANAZZI et

al. 2012). No Brasil, os cachos são usualmente acondicionados em caixas de 20 Kg, as quais são conduzidas à *packing house* para limpeza, classificação e embalagem (EMBRAPA, 2004). Entretanto, esta fase é de curta duração, não proporcionando tempo hábil para a secagem adequada dos frutos. Assim, tratamentos em pré-colheita são mais fáceis de serem integrados ao manejo convencional. Os tratamentos em pré-colheita são geralmente mais eficazes do que em pós-colheita, considerando que os cachos não são lavados devido ao longo período requerido para secagem, além da maior probabilidade de realização de injúrias mecânicas (IPPOLITO et al. 2010). Ainda, a aplicação de tratamentos em campo para controle de doenças na fase de pós-colheita pode proporcionar melhores resultados, visto que a concentração de inóculo pode ser reduzida e o período de incubação também pode variar, comparando-se com experimentos de laboratório (SEREY; TORRES; LATORRE, 2007). Desta forma, o fosfito de potássio pode ser integrado ao manejo da cultura da uva. Entretanto, Monosco-Ramírez; Montesinos-Herrero; Palou (2013), afirmam que uma desvantagem no uso de sais inorgânicos consiste no reduzido efeito protetor à infecções decorrentes de injúrias posteriores ao tratamento, o que reduz a eficiência do controle. Isto fortalece a aplicação de medidas integradas no manejo de doenças pós-colheita.

Considerando a eficiência do fosfito de potássio no controle de oomicetos, como *Plasmopara viticola*, o agente causal da doença de maior importância na cultura da uva, o míldio, a inclusão deste sal ao manejo pode trazer benefícios, como controle de um amplo espectro de patógenos, causadores de perdas no campo e em pós-colheita além de um incremento na produtividade (PEREIRA et al. 2012; THAO; YAMAKAWA, 2009; DAGOSTIN et al. 2011).

Finalmente, o presente trabalho pode ser considerado como uma avaliação preliminar do potencial do fosfito no controle de doenças pós-colheita em uvas de mesa. Com os promissores resultados alcançados, novos ensaios devem ser conduzidos em campo para a avaliação do produto em escala comercial e seus efeitos no desenvolvimento de patógenos na fase de pós-colheita, já que a logística da cadeia produtiva da uva dificulta a aplicação do produto em pós-colheita. Desta forma, o uso de sais inorgânicos apresenta-se como boa opção tanto para a agricultura convencional quanto para a orgânica de forma a complementar o manejo integrado de doenças de plantas com o objetivo reduzir o número de pulverizações

de fungicidas e, consequentemente, o resíduo tóxico no ambiente, nos frutos e no manejo da resistência de patógenos.

2.6 Conclusões

Os patógenos *Rhizopus stolonifer, Botrytis cinerea e Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram sensibilidade *in vitro* ao fosfito de potássio.

Em geral, os tratamentos protetores e curativos proporcionaram efeito semelhante no controle das doenças pós-colheita em uva, exceto para a podridão mole em que o controle da doença foi superior no tratamento curativo.

Nas condições do presente trabalho, não foram observados efeitos negativos na qualidade físico-química de cachos de uva ´Itália tratados com o fosfito.

Referências

ABREU, F.M.; LOURENÇO, S.A.; BASSETO, E.; GONÇALVES, F.P.; MARTINS, M.C.; AMORIM, L. Efeito de sanificantes no controle pós-colheita da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pêssegos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 86-88, 2008.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.922p.

AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 222-227, 2011.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia:** Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2 p. 639-651.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Monografias de agrotóxicos autorizadas. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias. Acesso em: 04 maio 2013.

BAGGIO, J.S. **Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da podridão mole.** 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ´Luiz de Queiroz´, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BERGER, R.D. The analysis of effects of control measures on the development of epidemics. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Ed.).**Experimental techniques in plant disease epidemiology**. New York: Springer-Verlag. 1988. p. 137-151.

BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; DEZANET, A.; LIMA, E.B.; NETO, P.H.; ÁVILA, R.D.; SIEGA, V. Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 265-268, 2007.

BOCK, C.H.; BRENNEMAN, T.B.; HOTCHKISS, M.W.; WOOD, B.W. Trunk applications of phosphite for the control of foliar and fruit scab on pecan. **Crop Protection**, Guildford, v. 54, p. 213-220, 2013.

BRACKMANN, A.; GIEHL, R.F.H.; SESTARI, I.; STEFFENS, C.A. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs 'Fuji' durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34. n. 4, p. 1039-1042, 2004.

BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. **Fungicide resistance in crop pathogens**: how can it be managed? Brussels: Croplife International. 2007. 56p.

BRUCE, C.F.B. **Desenvolvimento de métodos de detecção precoce de infecções quiescentes de *Colletotrichum* spp. em mamão.** 2010. 85p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A. Doenças da uva. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 228, p. 50-55, 2005.

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

CARVALHO, H.H.; JONG, E.V.; BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B.; TERRA, M.F. **Alimentos:** métodos físicos e químicos de análise. Porto Alegre: Ed FRGS, 2002. 180p.

CASTILLO, S.; NAVARRO, D.; ZAPATA, P.J.; GUILLÉN, F.; VALERO, D.; SERRANO, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, D. Antifungal efficacy of *Aloe vera in vitro* and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 57, p. 183-188, 2010.

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

CERIONI, L.; RAPISARDA, V.A., DOCTOR, J.; FIKKERT, S.; RUIZ, T.; FASSEL, R.; SMILANICK, J.L. Use of phosphite salts in laboratory and semicommercial tests to control citrus postharvest decay. **Plant Disease**, St Paul, v. 97, p. 201-212, 2013b.

CERIONI, L.; SEPULVEDA, M.; RUBIO-AMES, Z.; VOLENTINI, S.I.; RODRÍGUEZ-MONTELONGO, L.; SMILANICK, J.L.; RAMALLO, J.; RAPISARDA, V.A. Control of lemon postharvest diseases by low-toxicit salts combined with hydrogen peroxide and heat. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 17-21, 2013a.

CORRÊA, L.S.; BOLIANI, A.C. O cultivo de uvas de mesa no Brasil e no mundo e sua importância econômica, in: BOLIANI, A.C.; CORRÊA, L.S. Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização.: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE UVAS DE MESA, 2001. Ilha Solteira. **Anais...** Ilha Solteira:UNESP/FAPESP, 2001. 328p.

CRISOSTO, C.H.; GARNER, D.; CRISOSTO, G. Carbon dioxide-enriched atmospheres during cold storage limit losses from *Botrytis* but accelerate rachis browing of ´Redglobe´ table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 26, p. 181-189, 2002a.

CRISOSTO, C.H.; PALOU, L.; GARNER, D.; ARMSON, D.A. Concentration by time product and gas penetration after marine container fumigation of table grapes with reduced doses of sulfur dioxide. **HortTechnology**, Alexandria, v. 12, p. 241-245, 2002b.

DAGOSTIN, S.; SCHÄRER, H.; PERLOT, I.; TAMM, L. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 776-788, 2011.

DALIO, R.J.D.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V.; SILVA, A.C.; BLUMER, S.; PEREIRA, V.F.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S.F. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** Passo Fundo: RAPP, 2012. v. 20. p. 206-242.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P.S.; HARE, M.C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 1059-1075, 2011.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo da videira. 2 ed. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. Versão eletrônica. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/Cultivo da Videira_2ed/colheita.html Acesso em: 06 nov. 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo da videira.Petrolina: Embrapa Semi Árido, 2004. Versão eletrônica. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/colheita.htm Acesso em: 06 nov. 2013.

EUROPEAN COMISSION. Health & Consumers Directorate-General. **Review report for the active substance potassium phosphonates,** Brussels:European Comission, 2013. 9p.

FACCHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C. Introdução à fruticultura. In: FACCHINELLO, J.C.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. (Org.). **Fruticultura:** fundamentos e práticas. 2 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. Disponível em: www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/fruticultura_fundamentos_pratica/index.htm Acesso em: 26 nov. 2013

FAOSTAT. **FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION**. World grape production. 2011. Disponível em: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Acesso em : 10 maio 2013.

FAO. FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **Save food**: global iniciative on food losses and waste reduction. 2013a. Disponível em: http://www.fao.org/save-food/key-findings/en/ Acesso em : 10 maio 2013

FAO. **Codex alimentarius**: Pesticides residues in food and feed. Pesticide index. Roma, 2013b. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html Acesso em: 04 maio 2013

FAO - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally recognized as safe.** Data da atualização: 21 jun. 2013c. Disponível em: http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm084104.htm. Acesso em: 12 out. 2013

FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L.; ROMANAZZI, G. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweety cherry. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 78 p. 133-138, 2013.

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 606-611, 1984.

FLAHERTY, D.L.; CHRISTENSEN, L.P.; LANINI, W.T.; MAROIS, J.J.; PHILIPS, P.A.; WILSON, L.T. **Grape Pest Management.** University of California – Division of Agriculture and Natural Resources Pub: Davis. 1992. 400p.

GARRIDO, L.R.; SÔNEGO, O.R. **Podridão da Uva Madura ou Podridão de *Glomerella* – Biologia, Epidemiologia e Controle.** Bento Gonçalves: EMBRAPA, CNPUV, 2004. 10 p. (Circular Técnica, 52).Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDUQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.cnpuv.embrapa.br%2Fpublica%2Fcircular%2Fcir052.pdf&ei=8LGLUb_UEa640gHc2IGIAQ&usg=AFQjCNHwh6f2fqBsxkxCMcw3u_YDB3a31w&bvm=bv.46226182,d.dmQ Acesso em: 09 maio 2013.

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, p. 211–217, 2010.

GPO. U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE. **Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food.** 2013. Disponível em: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=&SID=239fd5ab67ce6a0bd51fd8bdfacce44d&n=40y25.0.1.1.28&r=PART&ty=HTML#40:25.0.1.1.28.4.19.124. Acesso em: 20 maio 2013.

GUEST, D.; GRANT, B.R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Review**, Cambridge, v. 66, p. 159-187, 1991.

HARDY, G.E.St.J.; BARRET, S.; SHEARER, B.L. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen*Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 30, n. 2, p. 133-139, 2001.

HARVEY, J.M.; HARRIS, C.M.; HANKE, T.A.; HARTSELL, P. Sulfur dioxide fumigation of table grapes: relative sorption of SO_2 by fruit and packages, SO_2 residues, decay and bleaching. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 2, p. 132-135, 1988.

IPPOLITO, A. Control of postharvest decay by the integration of pre- and postharvest application of alternative means. In: International Workshop “Biological control of postharvest diseases: challenges and opportunities”, Oct., Leesburg, Virginia, USA, v.22 p. 25-28. 2010.

KOBILER, Y.; SHALOM, Y.; ROTH, I.; AKERMAN, M.; VINOKUR, Y.; FUCHS, Y. PRUSKY, D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the incidence of side and stem and rots in mango fruits. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 23, p. 23–32, 2001.

KOUSIK, C.S.; ADAMS, M.L.; JESTER, W.R.; HASSEL, R.; HARRISON, H.F.; HOLMES, G.J. Effect of cultural practices and fungicides on Phytophthora fruit rot of watermelon in the Carolinas. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 888-894, 2011.

LOBATO, M.C.; OLIVIERI, F.P.; DALEO, G.R.; ANDREU, A.B. Antimicrobial activity of phosphites against diferent potato pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 117, n. 3, p. 102-109, 2010.

LONG, P.G.; MILLER, S.A.; DAVIS, L.K. Duration of fungicidal effect following injection of apple trees with fosetyl-Al. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 329-326, 1989

LUO, Y.; MA, Z.; MICHAILIDES, T.J. Analysis of factors affecting latent infection and sporulation of *Monilinia fructicola* on prune fruit. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p. 999-1003, 2001.

LUVISI, D.; SHOREY, H.; SMILANICK, J.L.; THOMPSON, J.; GUMP, B.H.; KNUTSON, J. **Sulfur dioxide fumigation of table grapes.** Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, 1992. 21p. (Bulletin, 1932).

MAPA, 2009. Instrução Normativa Conjunta 18/2009 de 28/05/2009. Regulamento técnico para o processamento, armazenamento e transporte de produtos orgânicos Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Legislacao/Nacional/Instrucao_Normativa_n_0_018_de_28-05-2009.pdf . Acesso em: 28 nov. 2013.

MAPA/Agrofit, 2013. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 04 maio 2013.

McDONALD, A.E.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence of plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 10, p. 1505-1519, 2001.

MILLER, J.S.; OLSEN, N.; WOODELL, L.; PORTER, L.D.; CLAYSON, S. Post-harvest applications of zoxamide and phosphate for control of potato tuber rots caused by oomycetes at harvest. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 83, p. 405-411, 2006.

MILLS, A.A.S.; PLATT, H.W.; HURTA, R.A.R. Effect of salt compounds on mycelia growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 34, p. 341-350, 2004.

MLIKOTA GABLER, F.; SMILANICK, J.L. Postharvest control of table grape gray mold detached berries with carbonate and bicarbonate salts and desinfectants. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, n. 1, p. 12-20, 2001.

MLIKOTA GABLER, F.; MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J.I.; SMILANICK, J.L. Integration of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 128-137, 2013.

MONOSCO-RAMÍREZ, P.A.; MONTESINOS-HERRERO, C.; PALOU, L. Characterization of postharvest treatments with sodium methylparaben to control citrus green and blue molds. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 128-137, 2013.

MONTESINOS-HERRERO, C.; RÍO, M.A.; PASTORA, C.; BRUNETTI, O.; PALOU, L. Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest penicillium decay on major citrus species and cultivars. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 52, p. 117–125, 2009.

MOREIRA, L.M.; MAY-DE-MIO, L.L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 405-411, 2009.

MOREIRA, L.M.; MAY-DE- MIO, L.L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; LIMA, M.L.R.Z.C.; POSSAMAI, J.C. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 395-398, 2002.

MUÑOZ, Z.; MORET, A.; GARCÉS, S. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 36-40, 2009.

NARAYANASAMY, P. **Postharvest pathogens and disease management.** New Jersey: John Wiley, 2006. 578p.

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

NJOMBOLWANA, N.S.; ERASMUS, A.; FOURIE, P.H. Evaluation of curative and curative and protective control of *Penicillium digitatum* following imazalil application in wax coating. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 77, p. 102-110, 2013.

OLIVEIRA, S.M.A.; TERAO, D.; DANTAS, S.A.F.; TAVARES, S.C.C.H. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA, S.M.A.; TERAO, D.; DANTAS, S.A.F.; TAVARES, S.C.C.H. (Ed.). **Patologia pós-colheita:** frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 19-44.

PARFITT, J.; BARTEHL, M.; MACNAUGHTON, S. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 365, p. 3065-3081, 2010.

PEARSON, R.C.; GOHEEN, A.C. **Compendium of Grape Diseases.** St. Paul: APS Press 1988. 121p.

PEREIRA, V.F.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; REGINA, M.A.; MOTA, R.V.; VITORINO, L.R.R. Fosfito de potássio no controle do míldio da videira e características físico-químicas de uvas Merlot. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1581-1588, 2012.

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

REBOLLAR-ALVITER, A.; WILSON, L.L.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphate with protectant efficacy of azoxystrobin and potassium phosphate for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 349-353, 2010.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by β-aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 933-936, 2003.

RIBEIRO, I.J.A. Doenças causadas por fungos e bactérias na cultura da videira. in: BOLIANI, A.C.; CORRÊA, L.S. **Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: Algraf Gráfica Editora, 2001. 328p.

ROMANAZZI, G.; LICHTER, A.; MLIKOTA GABLER, F.; SMILANICK, J.L. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 63, p. 141-147, 2012.

ROMANAZZI, G.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; DI VENERE, D.; SALERNO, M. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 5, p. 1862- 1867, 2002.

ROWER, C.L.; ERWIN, J.E. Horticultural applications of jasmonates: a review. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 83, n. 3, p. 283-304, 2008.

RUSSELL, P.E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management.** Brussels: Crop Life International, Brussels, 2002. 57p.

SALA, F.C.; DA COSTA, C.F.; ECHER, M.M.; MARTINS, M.C.; BLAT, S.F. Phosphite effect on hot and sweet pepper reaction to *Phytophthora capsici*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 462-495, 2004.

SANZANI, A.M.; SCHENA, L.; CICCO, V.; IPPOLITO, A. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 68, p. 64–71, 2012.

SEREY, R.A.; TORRES, R.; LATORRE, B.A. Pre- and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 34, n. 3, p. 215-224, 2007.

SMILANICK, J.L.; MANSOUR, M.; MLIKOTA GABLER, F.; MARGOSAN, D.A. HASHIM-BUCKEY, J. Control of postharvest gray mold of table grapes in the San Joaquin Valley of California by fungicides applied during the growing season. **Plant Disease**, St Paul, v. 94, p. 250-257, 2010.

SMILANICK, J.L. Integrated approaches to postharvest disease management in California citrus packinghouses. **Acta Horticulturae**, Den Hague, v. 905, p. 145-148, 2011.

TAO, H.T.B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator? **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, p. 228-234, 2009.

TAVARES, S.C.C.H.; SILVA, E.L.S.S. Doenças da Uva. In: OLIVEIRA, S.M.A.; TERAO, D.; DANTAS, S.A.F.; TAVARES, S.C.C.H. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 823-855.

USALL, J.; SMILANICK, J.; PALOU, PALOU, L.; DENIS-ARRUE, N.; TEIXIDÓ, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest gren mold of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 50, p.1-7, 2008.

VAN ETTEN, J.L.; KOSKI, R.K.; EL-OLEMY, M.M. Protein synthesis during fungal spore germination. IV. Transfer ribonucleic from germinated and ungerminated spores. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 100, n. 3, p. 1882-1886, 1969.

YOUSSEF, K.; ROBERTO, S.R. Applications of salts solutions before and after harvest affect the quality and incidence of postharvest gray mold of ´Itália´ table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 87, p. 95-102, 2014.

YOUSSEF, K.; LIGORIO, A.; SANZANI, S.M.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A. Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 57–63, 2012.

WEBSTER, J.; WEBBER, R.W.S. **Introduction to fungi**. 3th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 875p.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN JAN, J.A.L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, p. 561–580, 2007.

ZAHAVI, T.; COHEN, L.; WEISS, B.; SCHENA, L.; DAUS, A.; KAPLUNOV, T.; ZUTKHI, J.; BEN-ARIE, R.; DROBY, S. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, p. 115-124, 2000.

ZAINURI; JOYCE, D.C.; WEARING, A.H.; COATES, L.; TERRY, L. Effects of phosphonate and salicylic acid treatments on anthracnose disease development and ripening of ‘Kensington Pride’ mango fruit. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 41, p. 805-813, 2001.

3 MECANISMOS DE AÇÃO DO FOSFITO DE POTÁSSIO À *Rhizopus stolonifer*

Resumo

O fosfito de potássio possui expressivo potencial no controle de doenças de plantas, o qual ainda não é totalmente explorado. No Brasil, sua atual recomendação destina-se apenas à fertilização foliar em diversas culturas. Entretanto, o mecanismo de ação deste produto ainda não é definido. O objetivo deste trabalho foi estudar possíveis mecanismos de ação do fosfito de potássio sobre o micélio de *Rhizopus stolonifer* e na indução de resposta de defesa, utilizando bagas de uva como hospedeiro do patógeno. Foi determinado o efeito de diferentes concentrações de fosfito sobre a perda de eletrólitos, a peroxidação de lipídios, a síntese de proteínas e de parede celular *in vitro*. Diversos tratamentos foram conduzidos para avaliação *in vivo* da indução de respostas de defesa em bagas de uva tratadas ou não com fosfito, feridas ou não e inoculadas ou não com o patógeno, sendo avaliadas a atividade da guaiacol peroxidase e da concentração de compostos fenólicos totais. Houve expressiva elevação na perda de eletrólitos na maior concentração de fosfito empregada, porém, não foi observada alteração na peroxidação de lipídios no micélio do patógeno. A síntese de proteínas sofreu incremento em concentrações crescentes do produto, enquanto que as atividades de β-1,3-glucanase e quitinase foi reduzida no micélio cultivado na presença do fosfito. Análises de microscopia eletrônica confirmaram estes resultados. Não houve elevação na atividade de guaiacol peroxidase e na concentração de compostos fenólicos totais em bagas de uva tratadas com fosfito, feriadas e inoculadas com o patógeno, porém, houve 25% de controle da doença em bagas que receberam aplicação de fosfito. Desta forma, pode-se concluir que, o fosfito de potássio atua sobre a permeabilidade de membrana, a síntese de proteínas e de parede celular no micélio de *R. stolonifer*. Por sua vez, a atividade de guaiacol peroxidase e a concentração de compostos fenólicos totais não evidenciaram a indução de respostas de defesa em uva. Porém, o controle da doença obtido pode ser atribuído ao efeito direto do produto ao patógeno.

Palavras-chave: Ação fungitóxica; Membrana plasmática; Parede celular; Sal inorgânico

Abstract

Potassium phosphite has an expressive potential on plant disease control, which is not fully explored yet. In Brazil, its current recommendation is only for foliar fertilization in several crops. However, the mode of action of phosphite is still unknown. The objective of this work was to study possible modes of action of potassium phosphite on the *Rhizopus stolonifer* mycelium and on the defense responses, by using grape berries. The effect of different concentrations of phosphite was evaluated based upon electrolyte leakage, lipid peroxidation, protein synthesis and cell wall synthesis. Some treatments were carried out to evaluate the defense induction in grape berries treated or not, wounded or not and inoculated or not with the pathogen to determine the guaiacol peroxidase activity and phenolic compound concentration. There was an expressive reduction on electrolyte leakage on the highest phosphite concentration used, however, there were no changes on lipid

peroxidation in the pathogen mycelium. The synthesis of protein increased due to increasing concentrations of phosphite while the β-1,3-glucanase and chitinase activities decreased in the mycelium. The electron microscopy analysis confirmed the results. On the other hand, the guaiacol peroxidase activity and phenolic compound concentration didn´t show the induction of defense responses in the berries. However, the disease control observed can be attributed to the phosphite direct effect on the pathogen.

Keywords: Fungitoxic action; Cell membrane; Cell wall; Inorganic salt

3.1 Introdução

A redução de resíduos em alimentos tem sido debatida com frequência, devido aos altos índices encontrados em pesquisas recentes (ANVISA, 2010). Desta forma, a utilização de produtos com baixos risco alimentar, social e ecológico, como o fosfito de potássio, são uma alternativa em potencial no manejo de doenças de plantas (DELIOPOULUS; KETTLLEWELL; HARE, 2010).

Os fosfitos tem sido estudados tanto como fertilizante foliar (ÁVILA et al. 2012; MOOR et al. 2009;), quanto como fungicida (ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNICK, 2010; SILVA et al. 2011). A ação fungicida é derivada da própria molécula de fosfito, a qual já é reconhecida no manejo de doenças causadas por *Phytophthora* e *Plasmopara*, agentes causais de podridões e doenças foliares, como a requeima do tomateiro e o míldio da videira (GOMES et al. 2011; KROMANN et al. 2012). Porém, este produto ainda não é utilizado no controle de doenças causadas por microrganismos do reino Fungi, os quais possuem características diferentes daqueles pertencentes à classe Oomycetes.

O Comitê de Ação a Resistência à Fungicidas, o FRAC, classifica os produtos derivados do ácido fosforoso, como o fosetyl-alumínio, rotineiramente utilizado no controle de oomicetos, e os fosfitos, como ingrediente ativo sem mecanismo de ação definido (FRAC, 2012). Entretanto, King et al. (2010) demonstraram através de observações citológicas, a ocorrência de lise de células de *Phytophthora cinnamomi* ao cultivarem o microrganismo em meio acrescido de fosfito. Os autores sugeriram uma possível ação do produto sobre a síntese da parede celular.

Um agente antifúngico deve atuar na seletividade à células fúngicas apenas, sem afetar outros organismos, possuir amplo espectro de ação, permitir armazenagem e ser acessível economicamente (GOZALBO et al. 1993; KIMATI, 2011). Os carboidratos constituintes da parede celular de fungos atuam como

barreira protetora e são necessários para o crescimento e viabilidade dos fungos. Assim, a inibição desses componentes indica um eficiente mecanismo de ação contra fungos (DURAN; CARY; CALVO, 2010).

Apesar do efeito direto dos fosfitos também sobre microrganismos do reino Fungi (GUEST; GRANT, 1991), ainda não foi esclarecida sua atuação sobre estes patógenos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar possíveis mecanismos de ação do fosfito de potássio sobre *R. stolonifer*, em função dos resultados encontrados no capítulo anterior, onde foi observada a inibição do crescimento micelial do patógeno.

3.2 Revisão Bibliográfica

3.2.1 *Rhizopus stolonifer*: classificação e morfologia

Rhizopus stolonifer [(Ehrenb.) Vuill. (1902)] é o agente etiológico da Podridão mole, doença de alta incidência em pós-colheita em diversas frutas, flores e hortaliças de importância econômica em todo o mundo (AGRIOS, 2005; BAUTISTA-BAÑOZ et al. 2003; GONÇALVES et al. 2010; OOKA, 1980).

De acordo com o Index Fungorum, este microrganismo é classificado como:

Reino: **Fungi**

Filo: **Zygomycota**

Subfilo: **Mucoromycotina**

Ordem: **Mucorales**

Família: **Rhizopodaceae**

Gênero: ***Rhizopus***

Espécie: ***Rhizopus stolonifer***

Como membro do Filo Zygomycota, *R. stolonifer* possui hifas cenocíticas, parede celular constituída de quitina e β-1,3-glucana, sendo o ergosterol o esterol predominante na membrana (WEBSTER; WEBER, 2005; MASSOLA JR; KRUGNER, 2011).

À partir do micélio do patógeno, esporangióforos aéreos são formados e, no ápice de cada uma dessas estruturas, um esporângio enegrecido contendo grande quantidade de esporangiósporos. Durante o crescimento do patógeno, há produção de estólons para a exploração da superfície e rizoides para sustentação (AGRIOS,

2005). O patógeno é de crescimento rápido, sendo que, em condições favoráveis, o micélio é capaz de tomar a superfície de uma placa rapidamente.

3.2.2 Fosfito de potássio: aspectos gerais e aplicações

O fósforo (P) é um dos macroelementos requerido no desenvolvimento de organismos vivos, participando de processos vitais como a fotossíntese e a respiração, na forma de fosfato (PO_4^{3-}), a qual é disponível na natureza (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

O fornecimento deste nutriente às plantas dá-se principalmente pela adubação, em que os fertilizantes fosfatados, como o superfosfato simples, o mais comumente utilizado, são empregados na adubação de plantio e fornecem fósforo às plantas (VANEECKHAUTE et al., 2013). A fertilização foliar é utilizada para corrigir possíveis deficiências em macronutrientes, como N, P e K (FAGERIA et al. 2009).

Os fosfitos são raramente encontrados na natureza e não são prontamente utilizados como fonte de fósforo, pois as plantas não são capazes de metabolizá-lo (GUEST; GRANT, 1991; McDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001). Após a aplicação, o fosfito é absorvido pela planta e tem a capacidade de translocar via xilema e floema. Na indústria, o produto é obtido à partir da reação entre o ácido fosforoso e uma base. No caso do fosfito de potássio, utiliza-se o hidróxido de potássio.

Atualmente, o fosfito é recomendado apenas como fertilizante foliar no Brasil e, dependendo da formulação, é capaz de fornecer nutrientes como potássio, zinco, manganês, dentre outros. Porém, sabe-se que este produto pode ser usado para outra finalidade, devido à ação fungicida da molécula fosfito (DALIO et al. 2012; DELIOPOULUS; KETTELWELL; HARE, 2010; FEN; COFFEY et al. 1984; GRANT; GRANT; HARRIS, 1992; SMILIE et al. 1989). Em países como os Estados Unidos, França e Austrália o fosfito de potássio é aplicado com o objetivo de controlar doenças causadas por microrganismos da classe Oomycetes (HARDY et al. 2001; ABASSI; LAZAROVITZ, 2006; MILLER et al. 2006).

O ânion fosfito (HPO_3^{2-}) é estruturalmente similar ao fosfato. Porém, o ânion fosfito possui uma ligação P – H, enquanto o fosfato uma ligação P – OH. Esta simples diferença confere a atividade fungicida ao fosfito (PEGG et al. 1985; GUEST; BOMPEIX, 1990). Além disso, as enzimas das plantas tem capacidade de distinguir estes dois ânions devido à sua maior afinidade por fosfato (McDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001; GUEST; GRANT, 1991). Assim, o fosfito não participa de

processos bioquímicos como o fosfato, o que o torna não fitotóxico. Apesar de não interferir no metabolismo da planta, os fosfitos são prontamente absorvidos e persistem nos tecidos por longo tempo (OUIMETTE; COFFEY, 1989; GUEST; GRANT, 1991; PEGG et al. 1985).

Os fosfitos são reconhecidos pelo seu modo de ação complexo, devido, além da ação direta ao microrganismo, à potencialização de resposta de defesa da planta ou indução de resistência (DALIO et al., 2012; GUEST; GRANT, 1991; LIM et al. 2013). Entretanto, atualmente alguns fungicidas ainda não possuem modo de ação definido (FRAC, 2012). O fosetyl-alumínio (Fosetyl-Al), o qual é comercializado como Aliette®, foi descoberto na década de 70 e recomendado para o controle de Oomicetos. Porém, ainda hoje, os mecanismos de ação envolvidos neste processo ainda não são claros.

Assim, o uso de fosfito no manejo integrado pode reduzir o número de pulverizações de fungicidas convencionais, o que é interessante por reduzir resíduos tóxicos nos alimentos, o risco ao ambiente e às pessoas que trabalham na aplicação de agrotóxicos.

3.2.3 Mecanismos de ação do fosfito de potássio em microrganismos

O efeito direto de fosfitos sobre o desenvolvimento de oomicetos já é conhecido (DALIO et al., 2012; DERCKS; BUCHENAUER, 1987; FENN; COFFEY, 1984; SMILIE et al. 1989). Os fosfitos levam a inibição do crescimento micelial e esporulação e afetam a síntese da parede celular, exercendo atividade fungistática sobre o patógeno (DERCKS; BUCHNAUER, 1987; SMILIE et al. 1989; GUEST; BOMPEIX, 1990; PANICKER; GANGADHARAN, 1999).

Um estudo de transcriptômica do micélio revelou que, na presença de fosfito, genes que codificam proteínas envolvidas na síntese da parede celular, síntese de aminoácidos, metabolismo proteico, metabolismo energético, detoxificação de toxinas e estresse oxidativo tem alterações na sua expressão (KING et al. 2010). Porém, assim como os demais relatos disponíveis na literatura, este estudo refere-se à *Phytophthora cinnamomi*, um oomiceto. Entretanto, dentre os poucos relatos existentes na literatura, estudos sobre inibição do crescimento micelial foram realizados também para microrganismos do Reino Fungi, como *Colletotrichum* e *Rhizopus* (FENN; COFFEY, 1984). Contudo, estes ensaios apenas confirmaram o

efeito direto do fosfito. Não há outras informações sobre como o produto derivado do ácido fosforoso atua sobre o metabolismo do patógeno.

Ainda, nos casos em que o fosfito é recomendado no controle de doenças de plantas, os organismos-alvo são apenas aqueles pertencentes à classe Oomycetes. Entretanto, há na literatura diversos relatos sobre a eficiência de produtos derivados do ácido fosforoso que inibem o desenvolvimento de fungos como *Monilinia fructicola* e *Fusarium* spp., dentre outros (ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNICK 2010; FENN; COFFEY, 1984; GUEST; GRANT, 1991)

Assim, devido a seu baixo custo, baixo impacto ao ambiente, ausência de relatos de fitotoxidez e efetividade no controle de doenças causadas por patógenos tanto da classe Oomycetes quanto do Reino Fungi, o que demonstra um amplo espectro de ação de produto, o emprego do fosfito de potássio vem de encontro às necessidades atuais da agricultura, sendo um produto potencial para uso comercial.

3.3 Material e métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica e no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Agricultura na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP).

3.3.1 Isolado

O isolado de *Rhizopus stolonifer* foi obtido junto ao Laboratório de Epidemiologia da ESALQ/USP, o qual foi previamente identificado com o auxílio de técnicas moleculares (BAGGIO, 2012).

3.3.2 Fosfito de Potássio

Como fonte de fosfito de potássio foi utilizado Phytogard®, o qual é produzido pela Stoller do Brasil. O produto contém 28% de P_2O_5, obtido à partir de ácido fosforoso e 26% de K_2O, com densidade de 1,51 g L^{-1} e pH = 7. As concentrações utilizadas neste trabalho foram 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®, o que corresponde a 1,19, 2,38 e 4,76, g L^{-1} de fosfito de potássio, respectivamente.

3.3.3 Estudo de possíveis alvos de ação do fosfito de potássio sobre o micélio *R. stolonifer*

3.3.3.1 Obtenção de micélio

Foram transferidos cinco discos de micélio de *R. stolonifer* desenvolvido em meio batata-dextrose-ágar (BDA - Oxoid®: 39 g L^{-1}) para erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose (cocção de 200 g de batata L^{-1} água acrescido de 20 g de dextrose), no qual foram adicionados os volumes do produto comercial para obtenção das concentrações desejadas.

O material foi mantido sob agitação constante por quatro dias à 100 rpm em temperatura ambiente. Posteriormente, o micélio foi filtrado através de papel de filtro Whatmann n. 40 e lavado em água destilada por três vezes.

3.3.3.2 Efeito sobre a permeabilidade da membrana plasmática

3.3.3.2.1 Perda de eletrólitos

Visando demonstrar possível efeito do fosfito sobre a permeabilidade da membrana plasmática, foi mensurada a condutividade elétrica para a avaliação da perda de eletrólitos pelas hifas do patógeno.

O micélio obtido em meio líquido foi pesado e transferido para copo plástico, o qual continha 10 mL de uma solução de sacarose 0,2 M. Após 60 minutos, apenas a solução de sacarose foi transferida para tubo de ensaio e, em seguida, realizou-se a medição da condutividade elétrica com o auxílio de um condutivímetro. Os tratamentos utilizados foram: 1) tratamento controle negativo: em que o micélio do patógeno desenvolveu-se em meio de cultivo BDA apenas e com posterior transferência para solução de sacarose 0,2 M; 2) tratamento controle positivo: com crescimento do patógeno em meio BDA e, em seguida, transferência do micélio para solução de sacarose 0,2 M contendo 10 µL de Triton X-100, o qual é um detergente e atua sobre os lipídios da membrana, alterando sua permeabilidade; 3) fosfito de potássio, com crescimento do patógeno em meio BDA acrescido de 10 mL L^{-1} Phytogard®, cujo micélio foi transferido para solução de sacarose 0,2 M.

Este ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, sendo cada erlenmeyer considerado uma repetição. Os resultados foram expressos em condutividade elétrica, ou seja, µS cm^{-1} g micélio $fresco^{-1}$.

3.3.3.2.2 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi mensurada com base no método de Heath e Packer (1968) e de Cakmak e Host (1991). O micélio foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo e, em seguida, adicionou-se 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 1,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% à 0,3 g de micélio.

O macerado foi centrifugado à 9700 *g* por 5 minutos e, em seguida, 250 µL do sobrenadante foram transferidos para tubo de vidro juntamente com 1 mL de solução de TCA 20% acrescida de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, a qual foi preparada no momento do uso. O branco da reação constituiu-se de 1 mL da solução de TCA 20% + TBA (0,5%) e 250 µL de TCA 0,1%.

O material permaneceu em banho-maria à 95 °C por 30 minutos, com posterior paralisação da reação em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, o volume da reação foi transferido para tubos plásticos para centrifugação à 9700 *g* por 10 minutos. Após a centrifugação, as leituras dos sobrenadantes foram realizadas em espectrofotômetro à 532 nm e a concentração de malonaldeído (MDA) foi determinada pela seguinte fórmula:

Abs = B x C, onde
B = coeficiente de extinção molar, o qual equivale à 155 mM^{-1} cm^{-1} para o MDA
C = concentração
Assim:
C = (Abs/B) = mM MDA
Portanto,
MDA = {{[Abs/155)x2]x(1700/500)}/MF}x1000, onde
MF = massa fresca

Os dados foram expressos em nmol MDA g micélio $fresco^{-1}$.

3.3.3.3 Efeito sobre a síntese de proteínas

A extração das proteínas solúveis foi efetuada à partir da maceração do micélio na presença de nitrogênio líquido, seguido pela adição de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA, na proporção de 5 mL g de

micélio fresco^{-1}. O material foi centrifugado a 4 ºC durante 45 min a 15000 *g*, sendo que o sobrenadante foi considerado o extrato proteico.

Utilizou-se o reagente Protein Assay (BioRAD®), diluido cinco vezes, para a determinação de proteínas totais, de acordo com Bradford (1976). Para cada amostra foram utilizados 1000 µL da solução do reagente preparada e 20 µL do extrato proteico diluído sete vezes. A curva padrão foi determinada utilizando-se albumina de soro bovino (ASB).

O experimento foi preparado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se cinco repetições por tratamento, sendo que o micélio obtido em cada erlenmeyer foi considerado uma repetição.

3.3.3.4 Efeito sobre a síntese de parede celular

3.3.3.4.1 Atividade de β-1,3-glucanase

A fim de se verificar o efeito do fosfito sobre a síntese de parede celular, a qual possui β-glucana em sua composição dentre outros polímeros, foi determinada a atividade de β-1,3-glucanase. O substrato utilizado foi laminarina, um polissacarídeo obtido da alga *Laminaria digitata*, o qual reage com a enzima e libera moléculas de glicose.

Para a quantificação de açúcares redutores utilizou-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1989). A reação foi composta de 150 µL de laminarina (4 mg mL^{-1}) dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 100 µL do extrato proteico. Ao branco da reação foi adicionado apenas laminarina e, ainda, para cada amostra avaliada, também foi preparada uma reação controle composta de laminarina, extrato da amostra e reagente ADNS (ABELES; FOENCE, 1970).

Decorrida a incubação por 2 horas à 40 C, a reação foi paralisada com o acréscimo de 125 µL de ADNS, sendo a reação, em seguida, aquecida por 5 minutos em água fervente. Posteriormente, a reação foi resfriada em gelo e, ao volume da reação foram adicionados 1125 µL de água destilada. Após homogeneização, a leitura foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm.

A atividade enzimática foi expressa em mg de glicose liberada h^{-1} mg proteína^{-1}, com base em uma curva padrão de glicose.

3.3.3.4.2 Atividade de quitinase

A avaliação foi realizada por meio do uso do substrato “CM-chitin- RBV” (STANGARLIN; PASCHOLATI; LABATE, 2000). Para tanto, 200 µL do extrato proteico foram adicionados a 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2 mg mL-1). Após incubação por 45 min a 40 °C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1 M, seguida de centrifugação a 5.000 *g* / 5 min, a 4 °C. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada e os resultados foram expressos em unidades de absorbância min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

3.3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura

O preparo e observação das amostras em microscópio eletrônico de varredura foram realizados no NAP/MEPA da ESALQ/USP. O patógeno foi cultivado em placa de Petri, contendo 20 mL de meio batata-dextrose-ágar (39 g L^{-1} do meio sintético da marca Oxoid®) acrescido ou não de 10 mL L^{-1} de Phytogard®. O patógeno foi cultivado por 20 horas à temperatura ambiente e, posteriormente, um fragmento de 5 x 5 mm foi retirado dos bordos da colônia para processamento.

Os fragmentos foram imersos em solução de Karnovisky, contendo glutaraldeido 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, por 12 horas, lavados em tampão cacodilato 0,1 M (KARNOVISKY, 1965-modificado) e, posteriormente, lavados em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada. Em seguida, foram transferidos para solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M por uma hora e, subsequentemente, desidratadas em série de acetona crescente (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes, por 15 minutos para cada solução). As amostras foram secas ao ponto crítico, sendo utilizado o gás carbônico como meio de secagem. Os fragmentos foram montados em *stubs* e metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura.

3.3.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão

O patógeno foi crescido em meio líquido batata-dextrose (conforme item 3.3.3.1) nas concentrações de 0, 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®. Após quatro dias, o patógeno foi filtrado através de papel filtro Whatmann n. 40 e lavado com água destilada por três vezes.

Os fragmentos foram imersos em solução de Karnovisky, contendo glutaraldeido 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, por 12 horas, lavados em tampão cacodilato 0,1 M (KARNOVISKY, 1965-modificado) e, posteriormente, lavados em tampão cacodilato 0,05 M por três vezes de 10 minutos cada. Em seguida, foram transferidos para solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M por uma hora. Após a pós-fixação, as amostras foram submetidas à pré contrastação 'em bloc' com acetato de uranila 0,5%. Decorridas 12 horas, o material foi desidratado em série crescente de acetona de 30, 50, 70, 90 e 100%, por três vezes. Em seguida, o material foi transferido para solução de resina diluída em acetona (proporção 1:1; v/v) por 6 horas e, posteriormente, em resina pura por 12 horas. Os fragmentos foram transferidos para molde contendo resina pura por 72 horas a 70 °C. Após polimerização, os blocos foram trimados e, posteriormente, em ultramicrótomo foram obtidos cortes de 70 nm, os quais foram coletados em pequenas telas de cobre com película de Formvar (ROWLEY; MORAN, 1975). Os cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) para posterior observação em microscópio eletrônica de transmissão.

3.3.4 Estudo de possíveis mecanismos de ação do fosfito de potássio em sua interação com *R. stolonifer* e bagas de uva 'Itália

Para avaliação de possíveis respostas de defesa induzidas pela aplicação de fosfito de potássio foram utilizadas bagas de uva 'Itália, cujos cachos foram produzidos em Jales – SP e comercializados na CEASA de Campinas, cerca de 36 horas após a colheita. As bagas foram selecionadas e removidas do cacho com aproximadamente 5 mm de pedicelo, para evitar injúrias que se transformam em porta de entrada para patógenos. As bagas foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos e, em seguida, lavadas em água e com auxílio de um algodão umedecido, sendo o excesso de água e de possíveis resíduos removidos. Em seguida, as bagas foram transferidas para bandejas plásticas com doze cavidades, as quais foram depositadas sobre papel filtro umedecido em bandeja de poliestireno expandido. As bagas foram aspergidas com água ou fosfito (10 mL L^{-1} de Phytogard®), dependendo do tratamento, e após 16 horas, foram feridas ou não e inoculadas ou não, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos empregados para avaliação da indução de respostas de defesa por bagas de uva 'Itália'

Tratamentos			
Aspersão	Intervalo (h)	Ferimento	Inoculação
Água	16	Não	Não
Água	16	Sim	Não
Água	16	Sim	Sim
Fosfito*	16	Não	Não
Fosfito*	16	Sim	Não
Fosfito*	16	Sim	Sim

*10 mL L-1 de Phytogard®

O ferimento foi realizado na região oposta à inserção à ráquis por meio de uma agulha histológica cujo ápice foi demarcado com fita adesiva, de forma à permitir uma injúria de 2 mm de profundidade. A inoculação foi realizada pela deposição de 10 µL de uma suspensão de esporos de *R. stolonifer*, cuja concentração foi calibrada à 10^5 esporos mL^{-1}, sobre o ferimento. Após a inoculação, as bagas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas.

Todas as bagas foram seccionadas transversalmente, de acordo com a Figura 1, com posterior remoção das sementes devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos (ROCKNBACH et al. 2011). Uma metade foi utilizada para a extração de proteínas e, a outra, para a extração de compostos fenólicos.

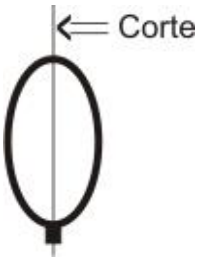


Figura 1 - Corte transversal da baga de uva 'Itália'

O ensaio foi instalado em delineamento em blocos ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições, sendo que uma bandeja com 12 bagas constituía uma repetição.

3.3.4.1 Extração de proteínas

Metade da secção da baga foi triturada com auxílio de liquidificador em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) na proporção 50 mL : 100 g de massa fresca.

Após a trituração, o material foi filtrado e centrifugado à 5000 *g* por 45 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi recuperado e mantido à -20 ºC.

3.3.4.2 Atividade de guaiacol peroxidase

A atividade de guaiacol peroxidase foi determinada de acordo com Roncato e Pascholati (1998). A reação foi composta de 1,5 mL do tampão da reação (100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio) e 1,5 mL do extrato proteico (item 3.3.4.1). Como branco da reação foi utilizado 1,5 mL de tampão da reação e 1,5 mL do tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). O tempo de reação foi de um minuto, na qual foi quantificada em espectrofotômetro a conversão de guaiacol à tetraguaiacol.

Para cálculo da atividade foi utilizado Δ $Abs_{470\ nm}$ (diferença, em absorbância, aos 0 e 60 segundos da amostra), sendo os resultados expressos em Δ $Abs_{470\ nm}$ min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

3.3.4.3 Determinação de proteínas totais

O sobrenadante foi liofilizado e, após o término do processo, água destilada foi adicionada de forma a se obter um extrato proteico dez vezes mais concentrado. Em seguida, procedeu-se a determinação de proteínas totais de acordo com Bradford (1976), conforme descrito no item 3.3.3.3.

3.3.4.4 Concentração de compostos fenólicos totais

Após a trituração de metade das bagas, 0,5 g do triturado foi transferido para tubo de microcentrífuga e congelado à -20 C. Quando do uso, 1,5 mL de metanol 80% foi adicionado ao material triturado, o qual foi posteriormente homogeneizado em vortex e mantido sob agitação constante por 24 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 12000 *g* por 4 minutos. Foi coletada uma alíquota de 150 µL do sobrenadante, à qual adicionou-se 150 µL do reagente Folin-Ciocauteu 0,25 N em um novo tubo. Após 3 minutos, adicionou-se 150 µL de carbonato de sódio 1 N, sendo os tubos mantidos em repouso por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1000 µL de água destilada e, após 30 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 725 nm. Os resultados foram expressos em µg de catecol mL^{-1}

g massa fresca^{-1}, com base em curva padrão de pirocatecol (RODRIGUES et al. 2005).

3.4 Resultados

3.4.1 Estudos dos mecanismos de ação do fosfito de potássio sobre o micélio de *R. stolonifer*

3.4.1.1 Efeito sobre a permeabilidade de membrana

3.4.1.1.1 Perda de eletrólitos

Houve diferença significativa entre os tratamentos frente à perda de eletrólitos por parte do micélio de *R. stolonifer* cultivado em meio acrescido de fosfito de potássio ($p < 0,05$) (Figura 2). Observou-se, neste ensaio, que a condutividade elétrica média foi de 97, 129, 142, e 611 µS cm^{-1} g micélio fresco^{-1}, a qual foi obtida do micélio do patógeno cultivado nas concentrações de 0, 2,5, 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®. A condutividade apresentada pelo micélio cultivado à 10 mL L^{-1} de Phytogard® foi cerca de 2,7 vezes superior ao resultado obtido à partir do micélio em solução com Triton X-100 (controle +) (224 µS cm^{-1} g micélio fresco^{-1}).

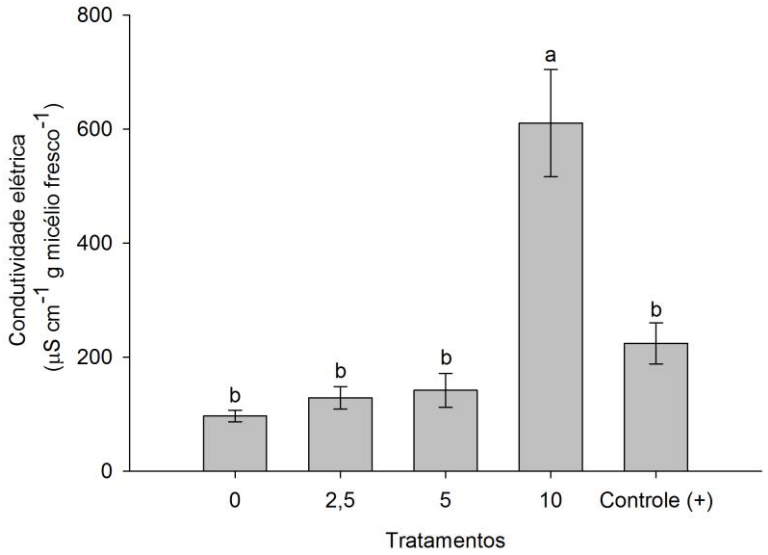


Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) sobre a perda de eletrólitos de micélio de *Rhizopus stolonifer* cultivados em meio líquido batata-dextrose, após quatro dias. Os dados são expressos em micro-Siemens cm^{-1} g micélio $fresco^{-1}$ (mS cm^{-1} g micélio $fresco^{-1}$) em função das diferenças na condutividade da membrana na solução de sacarose, onde o micélio foi imerso. Controle (-) representa somente micélio cultivado em meio sem adição de fosfito e transferido para solução de sacarose; controle (+) micélio fresco cultivado em meio sem adição de fosfito e imerso em solução de sacarose com detergente (Triton X-100) e micélio do patógeno cultivado em meio acrescido de diferentes concentrações de fosfito e transferido para solução de sacarose. Barras indicam o erro padrão da média. Colunas seguidas da mesma letras não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade

3.4.1.1.2 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi determinada com o objetivo de se avaliar o efeito do fosfito sobre os lipídios presentes na membrana plasmática de *R. stolonifer.* O malonaldeído é o produto majoritário da reação entre o ácido tiobarbitúrico e ácidos graxos poli-insaturados oxidados, o que permite inferir indiretamente sobre a integridade da membrana plasmática. Neste ensaio, não foram observadas diferenças nas concentrações de malonaldeído no micélio do patógeno, com os aumentos nas concentrações de fosfito de potássio utilizadas (Figura 3).

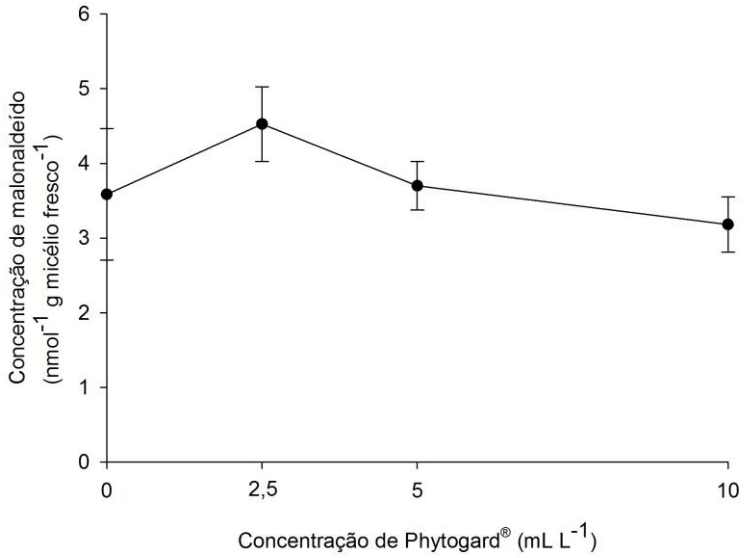


Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações do Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) sobre a peroxidação de lipídios do micélio de *Rhizopus stolonifer*, cultivado em meio líquido batata-dextrose após quatro dias. Barras indicam o erro padrão da média

3.4.1.2 Efeito sobre a síntese de proteínas

A elevação na concentração de fosfito de potássio proporcionou acréscimos na concentração de proteínas totais no micélio de *R. stolonifer*, em comparação com o tratamento controle (Figura 4). Em média, a concentração de proteínas foi 1,8 e 2,2 vezes maior no micélio do patógeno cultivado nas concentração de 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®, respectivamente.

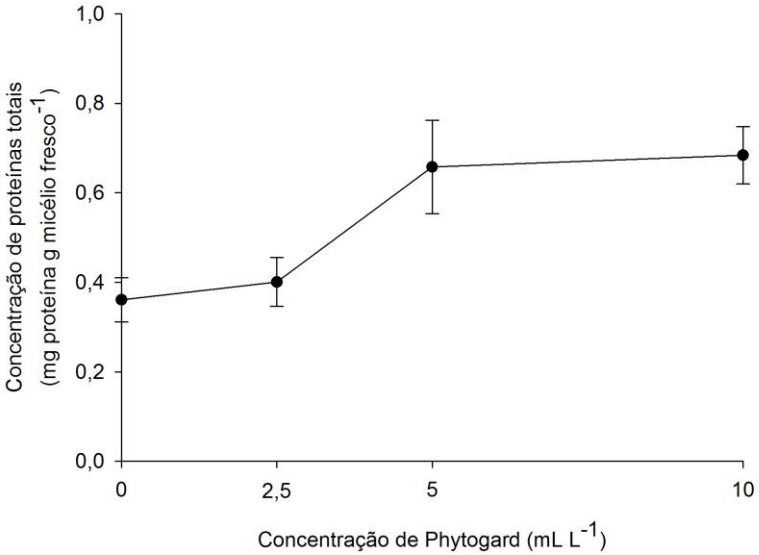


Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) sobre a síntese de proteínas no micélio de *Rhizopus stolonifer* cultivado em meio líquido batata-dextrose após quatro dias. Barras indicam o erro padrão da média

3.4.1.3 Efeito do fosfito sobre a síntese de parede celular

3.4.1.3.1 Efeito sobre a atividade de β-1,3-glucanase

Observa-se na Figura 5, o decréscimo na atividade de β-1,3-glucanase no micélio do patógeno cultivado em concentrações crescentes de fosfito. Nas concentrações de 5 e 10 mL L^{-1} de Phytogard®, a atividade da enzima foi inibida em cerca de 50%.

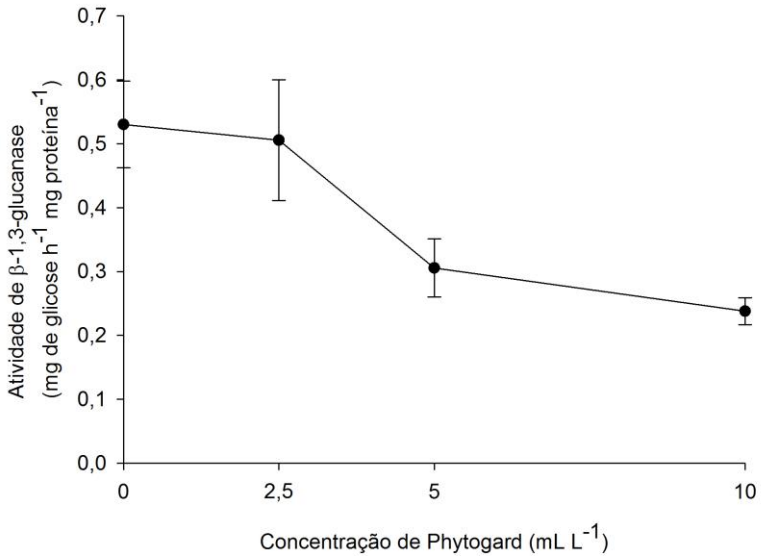


Figura 5 - Atividade de β-1,3-glucanase em micélio de *Rhizopus stolonifer*, cultivado em meio contendo diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) após quatro dias. As barras indicam o erro padrão da média

3.4.1.3.2 Atividade de quitinase

Houve redução na atividade de quitinase determinada à partir do micélio do patógeno cultivado em diferentes concentrações de fosfito. Observa-se na Figura 6, que não houve alteração na atividade da enzima no cultivo do micélio à 2,5 mL L-1 de Phytogard®. Entretanto, as concentrações de 5 e 10 mL -1 exibiram reduções na atividade de quitinase em 30 e 42%, respectivamente.

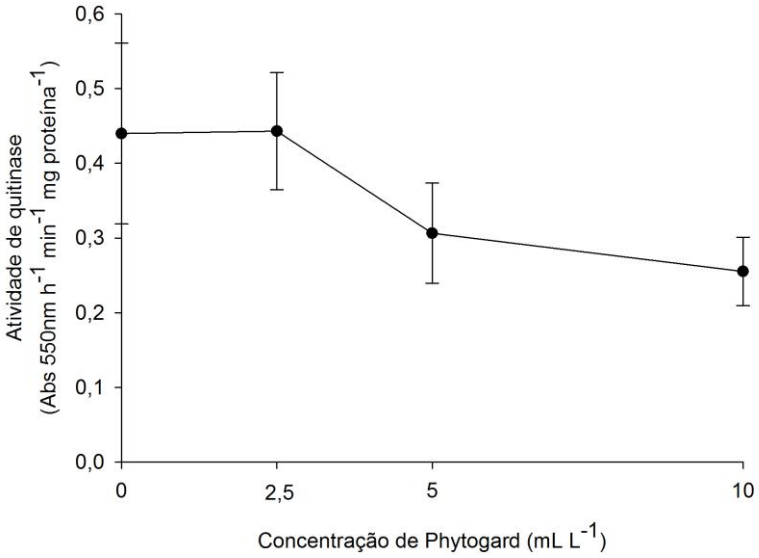


Figura 6 - Atividade da quitinase em micélio de *Rhizopus stolonifer*, cultivado em meio contendo diferentes concentrações de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) após quatro dias. As barras indicam o erro padrão da média

3.4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

Foram observadas alterações no micélio do patógeno cultivado na presença do fosfito, evidenciadas pela presença de hifas secundárias de menor calibre (Figura 7B), comparando-se com o tratamento controle (Figura 7A). As imagens permitem esta inferência, visto que foram obtidas no mesmo aumento.

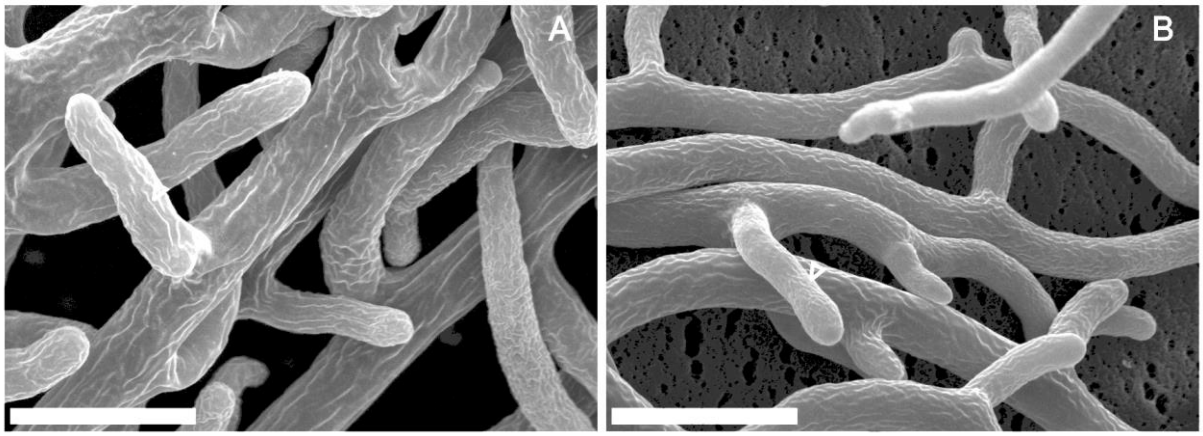


Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura. Micélio de *Rhizopus stolonifer* cultivado em meio batata-dextrose contendo 10 mL L^{-1} de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) após quatro dias. A: micélio cultivado apenas em meio de cultivo. B: micélio cultivado em meio de cultivo acrescido de fosfito. Setas: diferenciação entre a ramificação do micélio tratado ou não com fosfito. Barras = 30 µm

3.4.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As alterações observadas ao microscópio eletrônico de transmissão são evidentes no micélio cultivado em meio de cultivo contendo fosfito de potássio. Nas Figuras 8A e 8B, observou-se uniformidade da parede celular, da membrana plasmática e do conteúdo citoplasmático em hifa do patógeno. Entretanto, o cultivo de *R. stolonifer* na presença de fosfito evidenciou uma desorganização citoplasmática e abundância de ribossomos (Figura 8C). Além disso, a parede celular também apresentou-se desestruturada, exibindomenor densidade (Figura 8D).

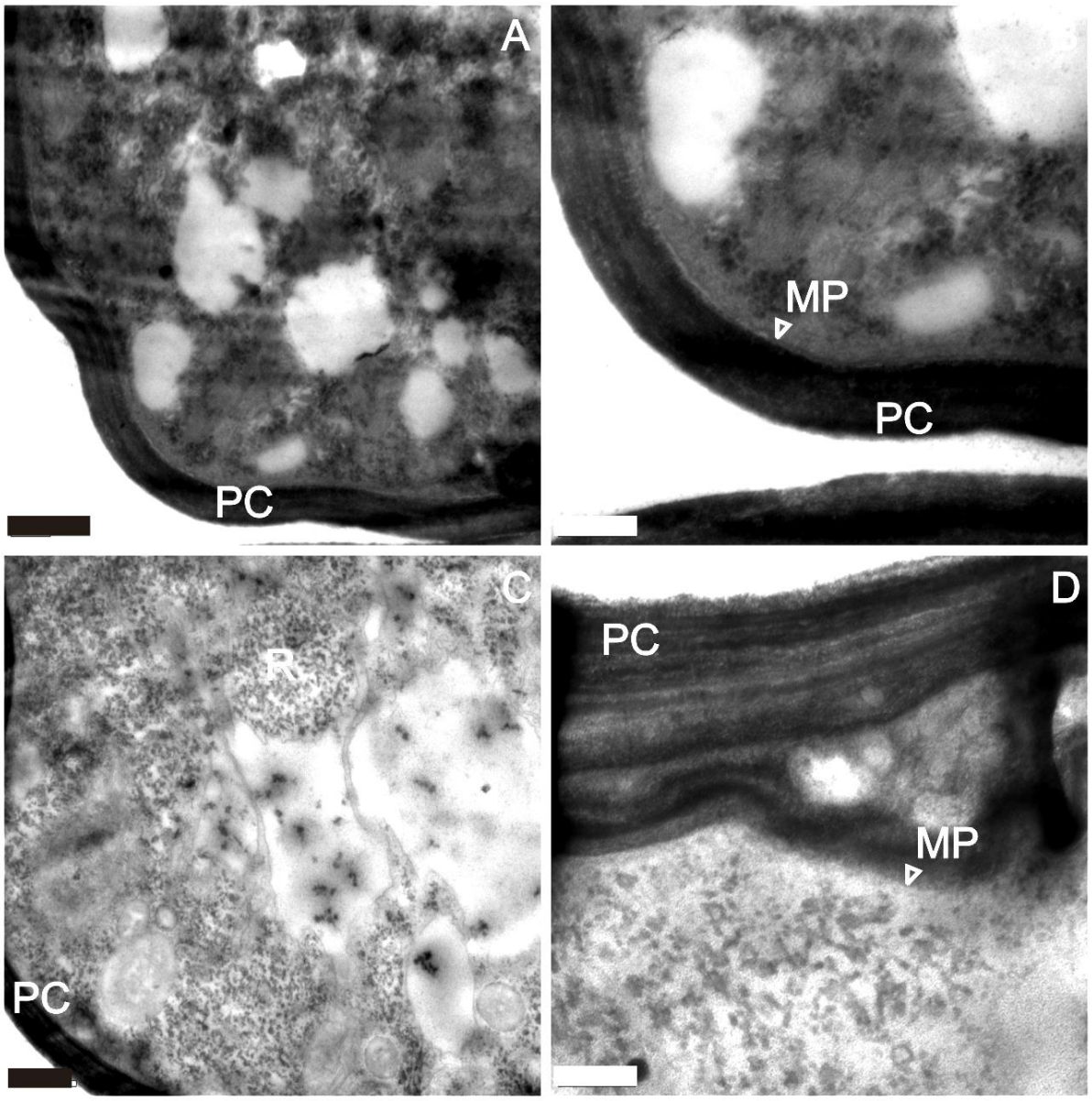


Figura 8 - Microscopia eletrônica de transmissão. Micélio de *Rhizopus stolonifer* cultivado em meio batata-dextrose contendo 10 mL L^{-1} de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) após quatro dias. A e B: micélio cultivado apenas em meio de cultivo. C e D: micélio cultivado em meio de cultivo acrescido de fosfito. PC = parede celular; MP = membrana plasmática; R = ribossomos. Barras: A e C = 0,4 µm. B e D = 200 nm

3.4.2 Estudo de possíveis mecanismos de ação do fosfito de potássio em sua interação com *R. stolonifer* e bagas de uva 'Itália

3.4.2.1 Atividade de guaiacol peroxidase

No dia zero, a atividade de guaiacol peroxidase nas bagas foi de 2516 ΔAbs 470 nm min^{-1} g massa $fresca^{-1}$. No dia 4, nos tratamentos sem inoculação do patógeno, não houve alteração na atividade enzimática de guaiacol peroxidase na presença ou não de fosfito no período estudado (Figura 9). Entretanto, observou-se

elevação da atividade da enzima apenas na presença do patógeno em bagas não tratadas, o que não ocorreu no tratamento com a aspersão de fosfito. A atividade enzimática não foi influenciada pela realização do ferimento.

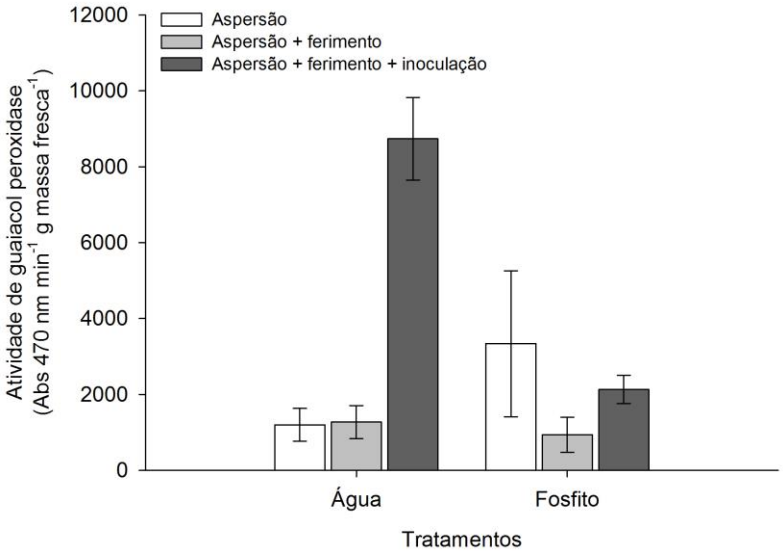


Figura 9 - Atividade de guaiacol peroxidase em bagas de uva ´Itália feridas ou não, inoculadas ou não com *Rhizopus stolonifer* e tratadas ou não com 10 mL L^{-1} de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) quatro dias após a inoculação. A aplicação dos tratamentos foi realizada por meio de aspersão, sendo que bagas não tratadas foram aspergidas com água. O material foi incubado à 25 ºC à 80% de umidade relativa por quatro dias. Cada tratamento consistiu de quatro repetições com doze bagas. As barras indicam o erro padrão da média

3.4.2.2 Concentração de fenóis totais

A concentração de compostos fenólicos totais no dia zero foi de 4,78 µg mL^{-1} g massa $fresca^{-1}$. Semelhantemente ao observado na atividade de guaiacol peroxidase, houve um discreto aumento na concentração de fenóis totais em bagas inoculadas e não tratadas com fosfito de potássio (Figura 10). A concentração de fenóis totais não foi influenciada pela aspersão de fosfito nem mesmo pelo ferimento realizado.

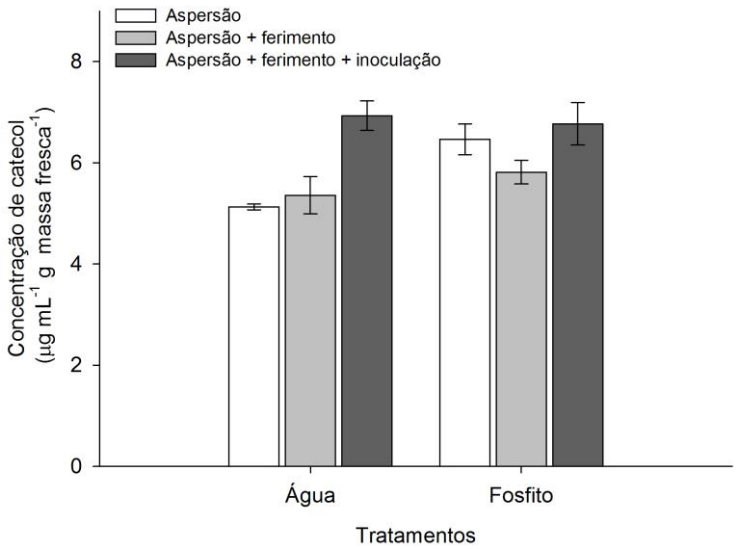


Figura 10 - Concentração de fenóis totais em bagas de uva ´Itália feridas ou não, inoculadas ou não com *Rhizopus stolonifer* e tratadas ou não com 10 mL L^{-1} de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) quatro dias após a inoculação. A aplicação dos tratamentos foi realizada por meio de aspersão, sendo que bagas não tratadas foram aspergidas com água. O material foi incubado à 25 ºC à 80% de umidade relativa por quatro dias. Cada tratamento consistiu de quatro repetições com doze bagas. As barras indicam o erro padrão da média

3.4.3.3 Efeito sobre a incidência da doença

Conforme esperado, em bagas não inoculadas com *R. stolonifer* e em bagas que receberam aspersão e posteriormente feriadas não houve desenvolvimento da podridão mole (Figura 11). Houve 25% de controle da doença em bagas tratadas com fosfito e feridas, em comparação com bagas não tratadas e feridas.

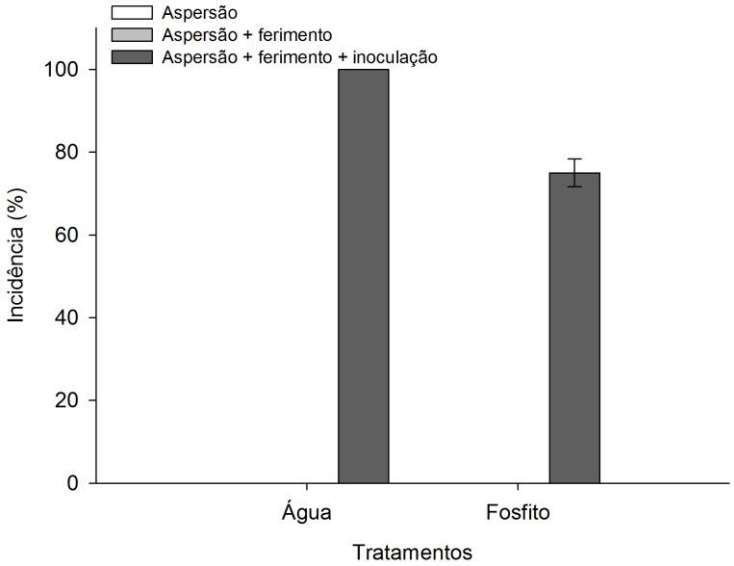


Figura 11 - Incidência da podridão mole em bagas de uva ´Itália feridas ou não, inoculadas ou não com *Rhizopus stolonifer* e tratadas ou não com 10 mL L^{-1} de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) quatro dias após a inoculação. A aplicação dos tratamentos foi realizada por meio de aspersão, sendo que bagas não tratadas foram aspergidas com água. O material foi incubado à 25 ºC à 80% de umidade relativa por quatro dias. Cada tratamento consistiu de quatro repetições com doze bagas. As barras indicam o erro padrão da média

3.5 Discussão

A ação dos fosfitos sobre oomicetos já é um fato consolidado na literatura (GRANT; GRANT; HARRIS, 1992; FENN; COFFEY, 1984; GUEST; GRANT, 1991; SMILIE; GRANT; GUEST, 1989; LIM et al. 2013; DALIO et al. 2012).

Neste trabalho, foi observado o efeito direto do fosfito de potássio sobre *R. stolonifer*, microrganismo este pertencente ao Reino Fungi. Houve elevada perda de eletrólitos através membrana plasmática do patógeno cultivado a 10 mL L^{-1} de Phytogard, a qual foi oito vezes superior ao observado no tratamento controle. De acordo com o modelo do mosaico fluido, proposto por Singer e Nicholson em 1972, todas as membranas biológicas tem organização molecular semelhante, o que permite inferir efeitos semelhantes entre membranas de plantas e de fungos. Bastías et al. (2010) trataram raízes de tomateiro com 150 mM de NaCl, onde os resultados obtidos evidenciaram perda de eletrólitos duas vezes maior em raízes mantidas em solução salina, comparando-se com o controle, o que corrobora com os resultados neste trabalho.

Em função dos resultados do presente trabalho, indicando a alteração da permeabilidade na membrana do patógeno cultivado na presença de fosfito de

potássio, foi determinado o efeito do fosfito sobre a peroxidação de lipídios da membrana. Esta análise permite inferir sobre a ação de radicais livres decorrentes do estresse causado pelo fosfito ao microrganismo, a qual pode conduzir à alteração na permeabilidade da membrana (FARMER; MUELLER, 2013).

A avaliação indireta da peroxidação de lipídios por meio da determinação do malonaldeido não evidenciou diferença entre os tratamentos, demonstrando que a elevada perda de eletrólitos não deve ser incitada pela alteração nos lipídios da membrana. Avis; Michaud; Tweddell (2007) observaram que a concentração de MDA permaneceu constante no micélio de *Fusarium sambucinum* tratado com cloreto de alumínio e metabissulfito de sódio, enquanto que *Rhizoctonia solani, Helminthosporium solani* e *Phytophthora infestans* apresentaram elevação na concentração de MDA no micélio tratado com estes sais. Isto indica que sais inorgânicos podem atuar diferentemente em microrganismos distintos. Alguns pesquisadores sugerem que produtos de ação fungicida, como triazóis e sais inorgânicos poderiam atuar nos lipídios da membrana, o que consequentemente, levaria a indução na peroxidação (LYR, 1988; AVIS; MICHAUD; TWEDDELL, 2007). Lyr (1988) observou correlação positiva entre a inibição do crescimento micelial de *Mucor macedo* e a elevação da peroxidação de lipídios. No capítulo 2, observou-se que concentrações crescentes de fosfito de potássio proporcionaram inibição no crescimento micelial de *R. stolonifer*. Porém, os resultados obtidos na avaliação da peroxidação de lipídios não demonstraram alteração na concentração de MDA.

O crescimento hifal está relacionado à produção de enzimas de síntese (quitina sintase, β-1,3-glucana sintase) e degradação (quitinase, β-1,3-glucanase) dos componentes da parede celular, como quitina, glucana, dentre outros. Estas enzimas são sintetizadas no citoplasma e conduzidas até o ápice da hifa ou ao ponto de ramificação por meio de vesículas. Ao aglomerado destas vesículas dá-se o nome de Spitzenkörper (GOODAY, 1995). Dependendo da classe do microrganismo, podem haver peculiaridades na síntese e na composição da parede celular. Em zigomicetos, não há a formação do Spitzenkörper, propriamente dito, mas de um centro de suprimento de vesículas proveniente do citoplasma. Quanto aos componentes da parede celular, em zigomicetos, a quitina sintetizada é imediatamente convertida à quitosana, por meio da desacetilação da quitina (WESSELS, 1994; LENARDON; MUNRO; GOW, 2010). Neste trabalho foi observada a redução nas atividades de β-1,3-glucanase e de quitinase no micélio de

R. stolonifer cultivado em meio acrescido de fosfito, o qual pode levar o patógeno a um estresse salino. Gooday e Schofield (1995) sugeriram que a atividade de quitina-sintase é reduzida em alta pressão osmótica.

A elevada síntese de proteína observada no micélio do patógeno cultivado na presença de fosfito nas análises bioquímica e ultraestrutural, com base na presença elevada de ribossomos, permite esclarecimento por duas hipóteses: este fato pode ser um reflexo do estresse salino, já que o microrganismo se desenvolveu em ambiente rico em um sal inorgânico ou devido à degradação da parede celular, em decorrência da ação do produto. Ensaios realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisae*, a qual é utilizada como modelo eucariótico para estudos médicos, bioquímicos, biológicos e moleculares, evidenciaram pela análise de imagens de gel de poliacrilamida PAGE bidimensional que houve um número de manchas proteicas detectadas três vezes maior após a adição de NaCl 1M, comparando-se com os resultados obtidos anteriormente ao acréscimo do sal (HIRASAWA et al. 2009). Ainda, estes autores compararam dois isolados da levedura, sendo um resistente e o outro sensível ao estresse salino. Segundo os autores, este processo ainda não é bem compreendido, porém, sabe-se a biossíntese de glicerol é elevada em *S. cerevisae* sob condições de estresse salino. Desta forma, infere-se que uma das funções do glicerol é atuar contra a elevação da pressão osmótica no interior das células (NIELSEN; JEWETT, 2008).

A outra hipótese pode ser explicada devido às alterações geradas por agentes perturbadores da parede celular que induzem a elevação na produção de enzimas relacionadas à síntese de parede, de forma à compensar o dano ocorrido na busca da manutenção da integridade (ADAMS, 2004; LENARDON; MUNRO; GOW, 2010). Isto ocorre em microrganismos que tratados com um ingrediente ativo da classe das equinocandinas, o qual é utilizado com antifúngico para tratamento em humanos (LEONARDON; MUNRO; GOW, 2010).

Os resultados bioquímicos e microscópicos obtidos neste trabalho evidenciam a atuação do fosfito em alvos como a membrana e a parede celular. À partir das secções ultraestruturais pode-se observar que não houve alteração estrutural da membrana plasmática. Entretanto, a elevada perda de eletrólitos indica uma alteração funcional desta estrutura, visto que houve evidente alteração da organização do citoplasma na presença do fosfito. O efeito negativo na síntese de parede proporcionado pelo fosfito, o qual foi evidenciado pela redução na atividade

de β-1,3-glucanase, pode ser correlacionado ao dano na parede celular proporcionado do patógeno cultivado na presença do produto.

Há relatos na literatura sugerindo o uso do fosfito de potássio como indutor de resistência, ou seja, como potencializador de respostas de defesa no hospedeiro que auxiliem no controle em diversos patossistemas, inclusive em pós-colheita (DALIO et al. 2012; TAO; YAKAMAWA, 2009; GUEST; GRANT, 1991; DELIOPOULUS; KETTLLEWELL; HARE, 2010; REUVENI; SHEGLOV; COHEN 2003; LIM et al. 2013; GOMES et al. 2011).

A enzima peroxidase e os compostos fenólicos são mecanismos de resistência da planta induzidos após a infecção do patógeno (PASCHOLATI, 2011). A peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio junto a oxidação de outros compostos como fenóis, alcaloides e auxinas (ZIPOR; OREN-SHAMIR, 2013). Sua atividade é potencializada em condições de estresse, lignificação, fortificação da parede celular, infecção por patógenos e, portanto, atua na proteção das plantas (SIEGEL, 1993). As peroxidases são consideradas um sistema modelo para estudos de atividade enzimática devido à eficiência dos protocolos existentes e a estabilidade de sua estrutura (ZIPOR; OREN-SHAMIR, 2013). Outros compostos envolvidos na proteção do hospedeiro à estresses são os compostos fenólicos. Características das bagas como cor, textura, sabor e adstringência são relacionadas à presença de fenóis, como flavonoides e antocianinas (TEIXEIRA et al. 2013). Porém, iniciada a infecção do patógeno, há aumento na síntese de fenóis, os quais são tóxicos para o microrganismo e para a célula vegetal (AGRIOS, 2005).

Não foram observadas elevações na atividade da enzima guaiacol peroxidase e na concentração de compostos fenólicos na presença de fosfito superiores ao tratamento controle. Isto pode ser devido à ação direta do fosfito sobre o microrganismo, o qual foi capaz de controlar o desenvolvimento da doença, o que não ocorreu no tratamento controle. Ainda, outras rotas metabólicas não avaliadas neste ensaio podem ter sido ativadas.

Este estudo apontou alguns mecanismos de ação pelo qual o fosfito de potássio atua sobre *R. stolonifer*. Entretanto, outros ensaios devem ser conduzidos para maior compreensão da atuação deste ingrediente ativo. Estudos com *Phytophthora citrophthora* demonstraram que uma concentração capaz de inibir apenas 20% do crescimento micelial gerou alterações na síntese de DNA (BARCHIETTO et al. 1992). Os resultados poderão contribuir para a classificação

dos fosfitos em um determinado grupo de fungicidas e, assim, colaborar no seu uso com segurança no manejo de doenças de plantas.

3.6 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o fosfito de potássio atua na permeabilidade de membrana, na síntese de parede celular e na síntese de proteínas no micélio de *R. stolonifer*.

Não houve elevação da atividade de guaiacol peroxidase e compostos fenólicos totais em bagas de uva ´Itália´ tratadas com o fosfito de potássio, indicando que o controle da doença deve ocorrer através de outros mecanismos, como o efeito direto do ingrediente ativo sobre o patógeno.

Referências

ABASSI, P.A.; LAZAROVITZ, G. Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses Pythium damping-off cucumber seedlings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 459-464, 2006.

ABELES, F.B.; FOENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β-1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 45, p. 305-400, 1970.

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, London, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b380fe004965d38ab6abf74ed75891ae/Relat%C3%B3rio+PARA+2010+-+Vers%C3%A3o+Final.pdf?MOD=AJPERES Acesso em: 19 maio 2013.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; STADNICK, M.J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

ÁVILA, F.W.; FAQUIN, W.; SILVA, D.R.G.; BASTOS, C.E.A.; OLIVEIRA, N.P.; SOARES. Phosphite as phosphorus source to grain yield of common bean poants grown in soils under low or adequate phosphate availability. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 6, p. 639-648, nov./dez., 2012.

AVIS, T.J.; MICHAUD, M.; TWEDDELL, R.J. Role of lipid composition and lipid peroxidation in the sensitivity of fungal plant pathogens to aluminum chloride and sodium metabisulfite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 9, p. 2820-2824, 2007.

BAGGIO, J.S. **Penetração de *Rhizopus stolonifer* em pêssegos não injuriados e progresso espaço-temporal da podridão mole.** 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ”Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BASTÍAS, E.; ALCARÁZ-LOPEZ, C.; BONILLA, I.; MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C.; BOLAÑOS, L.; CARVAJAL, M. Interactions between salinity and boron toxicity in tomato plants involve apoplastic calcium. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 167, n. 1, p. 54-60, 2010.

BARCHIETTO, T.; SAINDRENAN, P.; BOMPEIX, G. Physiological responses of *Phytophthora citrophthora* to a sub-inhibitory concentration of phosphonate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 42, p. 151-166, 1992.

BAUTISTA-BAÑOZ, S.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, E.; BARRERA-NECHA, L.L.; REYES-CHILPA, R.; WILSON, C.L. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytris cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 29, p. 81-92, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-257, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468, 1991.

DALIO, R.J.D.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V.; SILVA, A.C.; BLUMER, S.; PEREIRA, V.F.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S.F. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. In: LUZ, W.C. (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP, Passo Fundo, v. 20, p. 206-242, 2012.

DELIOPOULOS, T.; KETTLLEWELL, P.S.; HARE, M.C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 1059-1075, 2010.

DERCKS, W.; BUCHENAUER, H. Comparative studies on the mode of action of aluminium ethyl phosphite in four *Phytophthora* species. **Crop Protection**, Guildford, v. 6, p. 82-89, 1987.

DURAN, R.; CARY, J.W.; CALVO, A.M. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. **Toxins**, Basel, v. 2, p. 367-381, 2010.

FAGERIA, N.K.; BARBOSA FILHO, M.P.; MOREIRA, A.; GUIMARÃES, C.M. Foliar fertilization of crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 32, p. 1044–1064, 2009.

FARMER, E.E.; MUELLER, M.J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 429-450, 2013.

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 606-611, 1984.

FRAC. **Fungicide resistance action committee**. Mode of action of fungicides. 2012. Disponível em: http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC%20MoA%20Poster%202013%20update%20Final.pdf Acesso em: 11 maio 2013

GOMES, E.C.S.; LEITE, R.P.; SILVA, F.J.A.; CAVALCANTI, L.S.; NASCIMENTO, L.C.; SILVA, S.M. Manejo do míldio e ferrugem em videira com indutores de resistência: produtividade e qualidade pós-colheita. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 332-335, 2011.

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, p. 211–217, 2010.

GOODAY, G.W. The dynamics of hyphal growth. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 4, p. 385-394, 1995.

GOODAY, G.W.; SCHOFIELD, D. Regulation of chitin synthesis during growth of fungal hyphae: the role of membrane stress. **Canadian Journal of Botany**, Otawa, v. 73, n. S1, p. 114-121, 1995.

GOZALBO, D.; ELORZA, M.V.; SANJUAN, R.; MARCILLA, A.; VALENTÍN, E.; SENTANDREU, R. Critical steps in fungal cell wall synthesis: strategies for their inhibition. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 60, p. 337-345, 1993.

GRANT, B.R.; GRANT, J.H.; HARRIS, J. Inhibition of growth of *Phytophthora infestans* by phosphate and phosphonate in defined media. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 16, p. 240-244, 1992.

GUEST, D.I.; BOMPEIX, G. The complex mode of action of phosphonates. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 19, p. 113-115, 1990.

GUEST, D.; GRANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 66, p. 159-187, 1991.

HARDY, G.E.S.; BARRET, S.; SHEARER, B.L .The future of phosphate as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 30, p. 133-139, 2001.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HIRASAWA, T.; YAMADA, K.; NAGAHISA, K.; DINH, T.N.; FURUSAWA, C.; KATAKURA, Y.; SHIOYA, S.; SHIMIZU, H. Proteomic analysis of responses to osmotic stress in laboratory and sake-brewing strains of *Saccharomyces cerevisae.* **Process Biochemistry**, London, v. 44, p. 647-653, 2009.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1 p. 343-365.

KING, M.; REEVE, W.; VAN DER HOEK, M.B.; WILLIAMS, N.; MCCOMB, J.; O'BRIEN, P.A.; HARDY, G.E.S.J. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics & Genomics**, Berlin, v. 284, p. 425–435, 2010.

KROMANN, P.; PÉREZ, W.G.; TAIPE, A.; SCHULTE-GELDERMANN, E.; PRAKASH SHARMA, B.; ANDRADE-PIEDRA, J.L.; FORBES, G.A. Use of phosphonate to manage foliar potato late blight in developing countries. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, p. 1008-1015, 2012

LENARDON, M.; MUNRO, C.A.; GOW, N.A.R. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 416-423, 2010.

LIM, S.; BORZA, T.; PETERS, R.D.; COFFIN, R.H.; AL-MUGHRABI, K.I.; PINTO, D.M.; WANG-PRUSK, G. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggeres by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans.* **Journal of Proteomics**, Amsterdam, 2013. In press.

LYR, H. Lipid peroxidation: A side effect of sterol demethylation inhibitor fungicides in *Mucor mucedo* (L.) and *Ustilago maydis.* **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.32, p.197-294, 1988.

MASSOLA JR, 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, v. 1, p. 149-207.

McDONALD, A.E.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, p. 1505-1519, 2001.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-429, 1959.

MILLER, J.S.; OLSEN, N.; WOODELL, L.; PORTER, L.D.; CLAYSON, S. Post-harvest applications of zoxamide and phosphate for control of potato tuber rots caused by oomycetes at harvest. **American Journal of Potato Research**, Orona, v. 83, p. 269-278, 2006.

MOOR, U.; PÕLDMA, P; TÕNUTARE, T.; KARP, K.; STARAST, M.; VOOL, E. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 264-269, 2009.

NIELSEN, J.; JEWETT, M.C. Impact of systems neology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 122-131, 2008.

OOKA, J.J. Guava fruit rot caused by *Rhizopus stolonifer* in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, p. 412-413, 1980.

OUIMETTE, D.G.; COFFEY, M.D. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana*) seddlings and soils following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 212-215, 1989.

PANICKER, S.; GANGADHARAN, K. Controlling downy mildew of maize caused by *Peronosclerospora sorghi* by foliar sprays of phosphonic acid compounds. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, p. 115-118, 1999.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1 p. 593-636.

PEGG, K.G.; WHILEY, A.W.; SARANAH, J.B.; GLASS, R.J. Control of *Phytophthora* root rot of avocado with phosphorous acid. **Australasian Journal of Plant Pathology**, Collingwood, v. 14, p. 25-29, 1985.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by β-aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 933-936, 2003.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, n. 1, p.208-212, 1963.

ROCKENBACH, I.I.; GONZAGA, L.V.; RIZELIO, V.M.; GONÇALVES, A.E.S.S.; GENOVESE, M.I. FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 897-901, 2011.

RODRIGUES, F.A.; JURICK II, W.M.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** London, v. 66, p. 144-159, 2005.

RONCATO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisae*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 395-402, 1998.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: An organismic perspective - review. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 12, n. 3, p. 303-312, 1993.

SILVA, O.C.; SANTOS, H.A.A.; DALLA PRIA, M.; MAY-DE-MIO, L.L. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 598-604, 2011.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of membranes. **Science**, Washington, v. 175, p. 720-731, 1972.

SMILIE, R.; GRANT, B.R.; GUEST, D. The mode of action of phosphate: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, p. 921-926, 1989.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β-1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.

TAO, H.T.B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid: fungicide, fertilizer or bio-stimulator? **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 55, p. 228-234, 2009.

TEIXEIRA, A.; EIRAS-DIAS, J.; CASTELLARIN, S.D.; GERÓS, H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 18711-18739, 2013.

VANCE, C.P.; UDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, p. 423-447, 2003.

VANEECKHAUTE, C.; MEERS, E.; MICHELS, E.; BUYSSE, J.; TACK, F.M.G. Ecological and economic benefits of the application of bio-based mineral fertilizers in modern agriculture. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 49, p. 239-248, 2013.

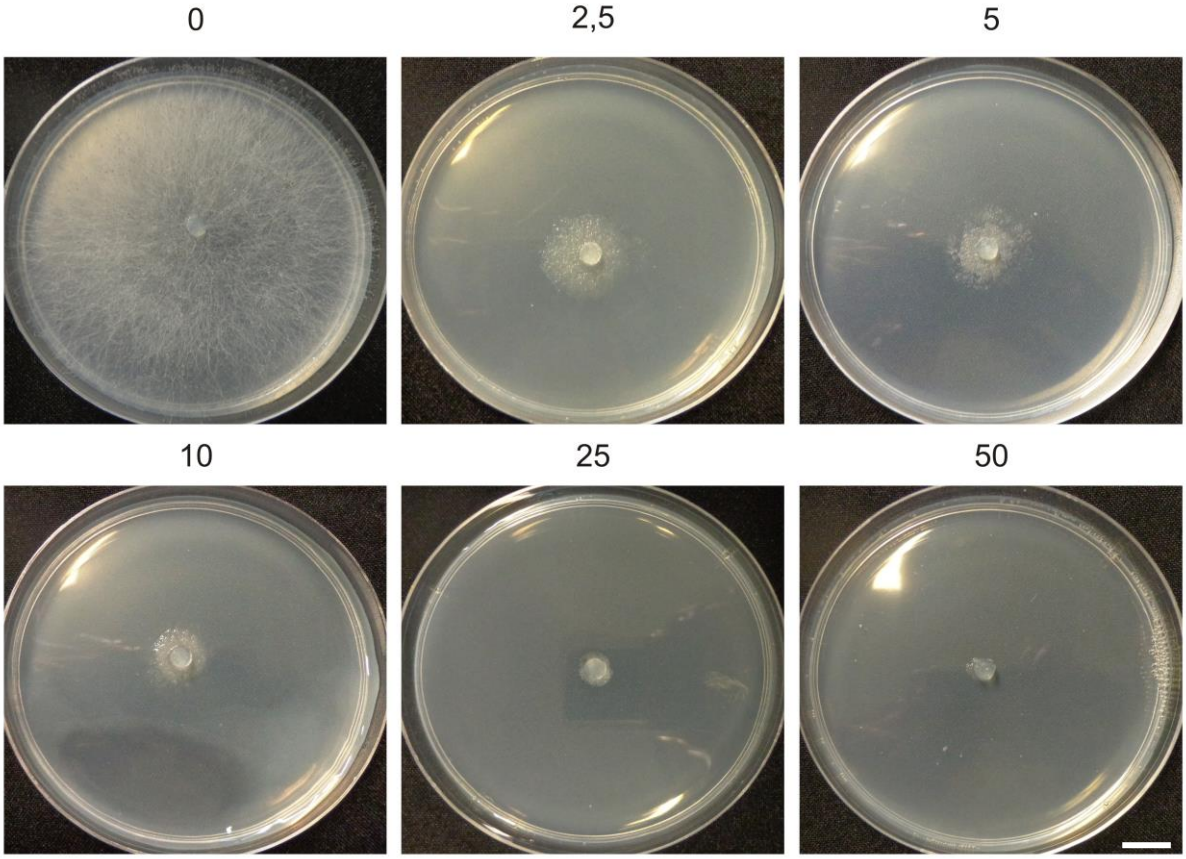
WEBSTER, J.; WEBBER, R.W.S. **Introduction to fungi**. 3th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 875p.

WESSELS, J.G.H. Developmental regulation of fungal cell wall formation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 413-437, 1994.

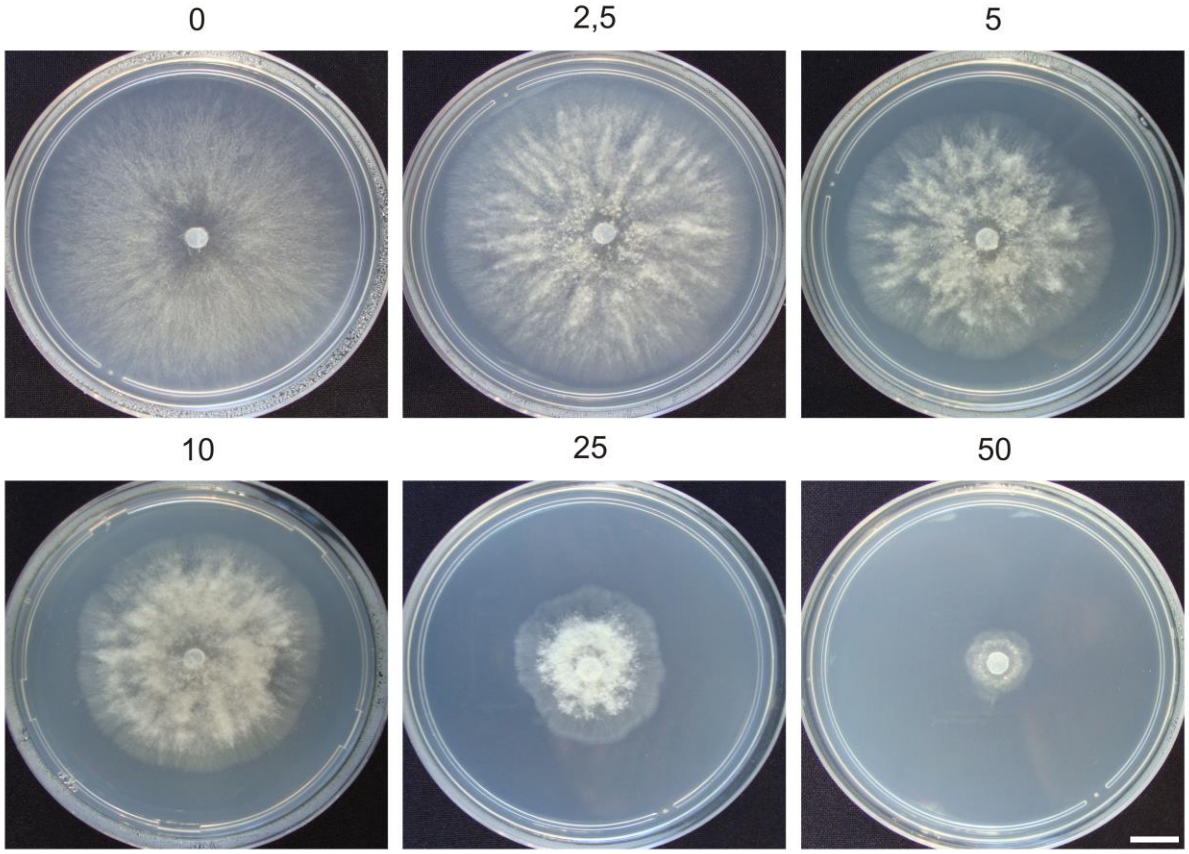
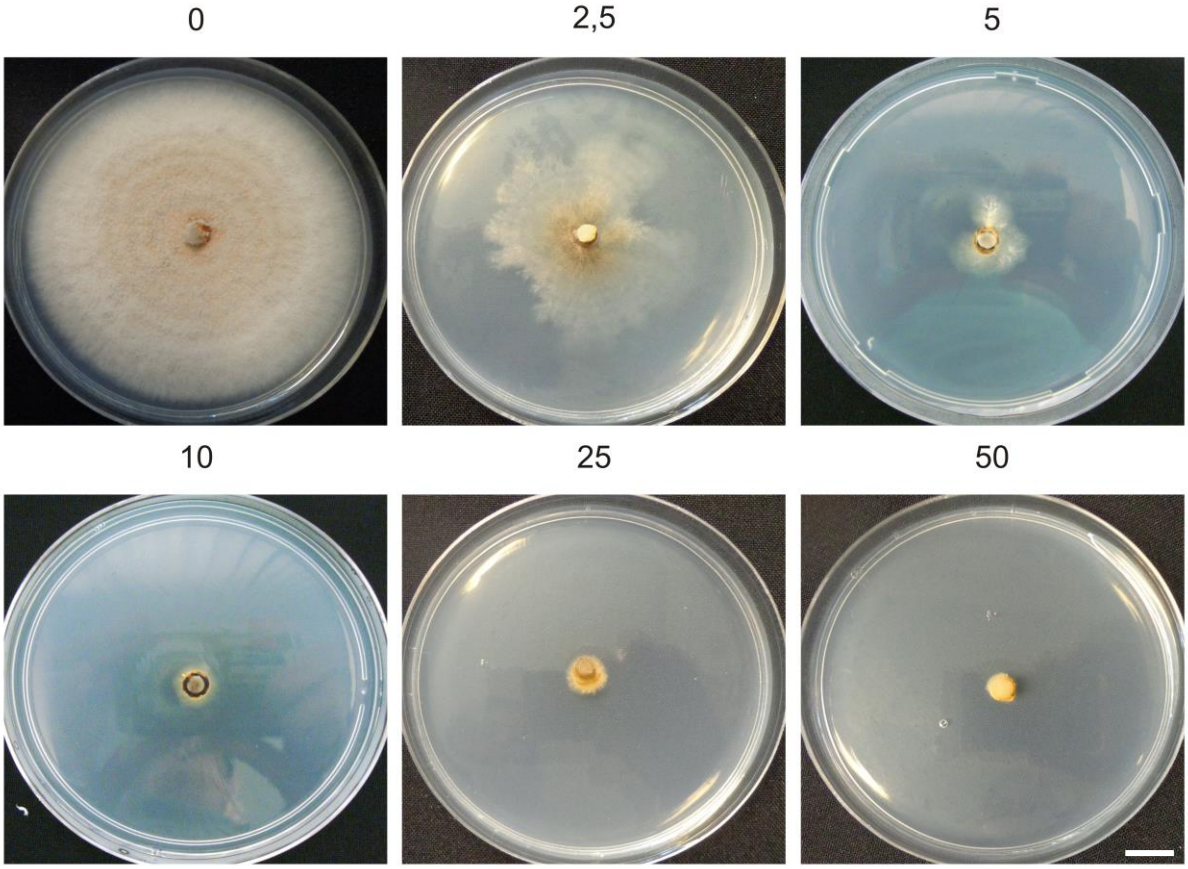
ZIPOR, G.; OREN-SHAMIR, M. Do vacuolar peroxidases act as plant caretakers? **Plant Science**, Limerick, v. 199-200, p. 41-47, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Efeito de diferentes concentrações (mL L^{-1}) de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) no crescimento micelial de *R. stolonifer* em meio de cultivo BDA, após 24 horas



APÊNDICE 2 - Efeito de diferentes concentrações (mL L^{-1}) de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) no crescimento micelial de *B. cinerea* em meio de cultivo BDA, após 3 dias. Barra = 1 cm



APÊNDICE 3 - Efeito de diferentes concentrações (mL L^{-1}) de Phytogard® (fosfito de potássio: P_2O_5 = 28%; K_2O = 26%) no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em meio de cultivo BDA, após 10 dias. Barra = 1 cm