

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

**Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa*
em laranja pós-colheita**

Maria Cristina Canale Rappussi-da-Silva

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

Piracicaba

2006

Maria Cristina Canale Rappussi-da-Silva
Engenheiro Agrônomo

**Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa*
em laranja pós-colheita**

Orientador:

Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

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

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Rappussi – da Silva, Maria Cristina

Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita / Maria Cristina Canale Rappussi da Silva. - - Piracicaba, 2006.
82 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1.Laranja 2.Pós-colheita 3.Mancha preta 4.Radiação ultravioleta 5.Resistência genética vegetal I. Título

CDD 664.94

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

À Deus, pela sua fidelidade nas realizações

Ao amado Emerson, pelo incentivo e apoio dedicados de maneira tão carinhosa

À minha mãe, Márcia, e minha irmã, Maria Carolina, pela participação em todos os momentos importantes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Sérgio Florentino Pascholati** pela orientação, amizade e confiança, que me incentivou desde os meus primeiros passos na pesquisa.

À Dra. **Eliane Aparecida Benato**, GEPC-ITAL pela co-orientação, amizade e auxílio que me estimularam a realizar trabalhos satisfatórios.

À Dra. **Patrícia Cia**, IAC, pela amizade e sugestões.

Ao Prof. Dr. Antônio de Góes, e à Dra. Sylvia Dias Guzzo e equipe, que auxiliaram na realização do trabalho .

Ao meu marido, Emerson, pelo carinho e apoio constante. Aos meus pais Wilson e Márcia e minha irmã, Carol, pela amizade desfrutada todo o tempo. Aos meus sogros, Roberto e Maria José, e cunhados, Ariana e Everton, pelos preciosos momentos em família.

Ao grande amigo Marcos César, pelo carinho e amizade em qualquer momento.

Aos pastores Marcílio e Sônia, Márcio e Atenildes, e aos amigos José e Elaine, pelos precisos aconselhamentos que auxiliaram em todas as áreas da minha vida.

Aos colegas de laboratório Odair, Maurício, Nívea, Solange, Ricardo, Leonardo, André, Marisa, Danilo, Camila, Cyntia e Ely pelo incentivo, sugestões e amizade que dedicaram ao nosso grupo maravilhosos momentos de alegria.

À **Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’**, ESALQ, onde me graduei e cursei o Mestrado. Aos professores e funcionários do Setor de Fitopatologia.

Ao **Grupo de Engenharia Pós-colheita** - GEPC, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, pelos subsídios para a realização deste trabalho e amizades realizadas neste período.

Ao Grupo Fischer pelo fornecimento de laranjas para a realização dos experimentos e à empresa Cyrbe, Sumaré – SP, pelo fornecimento da quitosana utilizada.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro do projeto e pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão Bibliográfica.....	12
2.1.1 Sintomatologia da mancha preta.....	12
2.1.2 Epidemiologia da mancha preta.....	13
2.1.3 Medidas de controle da mancha preta.....	14
2.1.4 Ativação dos mecanismos de defesa em plantas.....	15
2.1.5 Indução de resistência em pós-colheita.....	18
2.1.6 Quitosana.....	19
2.1.7 Radiação Ultravioleta (UV-C).....	21
2.1.8 Proteína harpina.....	22
2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.1 Local.....	24
2.2.2 Obtenção e cultivo do fitopatógeno.....	24
2.2.3 Efeito <i>in vitro</i> dos agentes abióticos sobre <i>G. citricarpa</i>	24
2.2.3.1 Quitosana.....	24
2.2.3.2 Radiação UV-C.....	25
2.2.3.3 Quitosana, ácido cítrico e fungicidas.....	26
2.2.4 Efeito dos agentes abióticos na proteção de laranja em condições de pós-colheita.....	27
2.2.4.1 Quitosana.....	28
2.2.4.2 Radiação UV-C.....	29
2.2.4.3 Quitosana, tiabendazol e imazalil.....	29
2.2.4.4 Quitosana, UV-C e tiabendazol.....	31
2.2.4.5 Quitosana e proteína harpina.....	32
2.2.4.6 Quitosana e ácido cítrico.....	33

2.2.5 Análises bioquímicas.....	33
2.2.5.1 Obtenção dos extratos para a determinação da atividade de enzimas.....	33
2.2.5.2 Atividade de quitinase.....	33
2.2.5.3 Atividade de β -1,3-glucanase.....	34
2.2.5.4 Atividade de polifenoxidase e fenilalanina amônia-liase.....	35
2.2.5.5 Atividade de peroxidase.....	35
2.2.5.6 Proteínas totais.....	36
2.2.5.7 Dosagem de fenóis totais.....	36
2.3 Resultados.....	37
2.3.1 Efeito <i>in vitro</i> dos agentes abióticos sobre <i>G. citricarpa</i>	37
2.3.1.1 Quitosana.....	37
2.3.1.2 Radiação UV-C.....	39
2.3.1.3 Quitosana, ácido cítrico e fungicidas.....	41
2.3.2 Efeito dos agentes abióticos na proteção de laranja pós-colheita.....	42
2.3.2.1 Quitosana.....	42
2.3.2.2 Radiação UV-C.....	44
2.3.2.3 Quitosana, tiabendazol e imazalil.....	48
2.3.2.4 Quitosana, UV-C e tiabendazol.....	55
2.3.2.5 Quitosana e proteína harpina.....	59
2.3.2.6 Quitosana e ácido cítrico.....	62
2.3.3 Análises bioquímicas.....	63
2.4 Discussão.....	65
2.4.1 Efeito <i>in vitro</i> da quitosana sobre <i>G. citricarpa</i>	65
2.4.2 Efeito <i>in vitro</i> da radiação UV-C sobre <i>G. citricarpa</i>	65
2.4.3 Efeito da quitosana na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta.....	66
2.4.4 Efeito da radiação UV-C na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta.....	68
2.4.5 Efeito da quitosana, UV-C e tiabendazol na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta.....	69
2.4.6 Efeito da quitosana, proteína harpina e ácido cítrico na proteção de laranja pós-	

colheita contra a mancha preta.....	70
2.4.7 Análises bioquímicas.....	71
3 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	81

RESUMO

Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja, sendo esta uma das mais importantes atividades econômicas para o país. Os frutos são afetados pela mancha preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa*, que deprecia comercialmente os frutos, provoca queda prematura e eleva o custo de produção. Medidas alternativas ao controle químico clássico vêm sendo estudadas e, neste contexto, insere-se a indução de resistência. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* da quitosana e radiação UV-C sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressórios por *G. citricarpa* e a ação destes agentes abióticos no controle da doença em laranjas pós-colheita, sob armazenamento ambiente e refrigerado, estudando-se também mecanismos de resistência ativados no tecido vegetal em resposta ao tratamento de melhor eficiência. Para tanto, foram utilizadas as concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% de quitosana e as doses de 0,52; 1,04; 3,13; 10,44 e 15,66 kJ.m⁻² da radiação UV-C. A quitosana inibiu o crescimento micelial do fungo e estimulou a germinação e formação de apressórios, os quais se mostraram morfológicamente alterados. A UV-C não inibiu o crescimento micelial, porém a maior dose ocasionou o menor crescimento. Para os experimentos *in vivo*, laranjas foram coletadas, lavadas, sanitizadas com hipoclorito e posteriormente tratadas. As concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% de quitosana e a dose de 7 kJ m⁻² da UV-C apresentaram melhor resultado em laranjas ‘Valência’ na redução dos sintomas. Análise da cor da casca dos frutos irradiados revelou que houve leve escurecimento. Os fungicidas tiabendazol e imazalil não controlaram a doença em laranjas ‘Pêra Rio’, porém, obteve-se menos lesões nos frutos tratados com os fungicidas em combinação com quitosana, tanto em temperatura ambiente quanto em refrigeração. Análises da cor da casca indicaram amarelecimento e não houve alterações significativas nos teores de sólidos solúveis, acidez titulável, pH, vitamina C e *ratio*. Nos ensaios com quitosana, tiabendazol e UV-C, a quitosana apresentou melhor controle da doença, aplicada isoladamente ou em conjunto com o fungicida e UV-C, em temperatura ambiente ou refrigeração. A quitosana e a proteína harpina apresentaram controle semelhante e, em comparação com o ácido cítrico, a quitosana ocasionou melhor controle em laranjas ‘Valência’. Para análises bioquímicas, amostras de flavedo foram homogeneizadas em de tampão acetato, com posterior centrifugação, coletando-se o sobrenadante. Para as reações enzimáticas, foram utilizados os reagentes CM-chitin-RBV, CM-Curdlan-RBB, guaiacol, catecol e L-fenilalanina para quitinase, glucanase, peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, respectivamente. Para a determinação de fenóis, amostras do flavedo foram homogeneizadas em metanol acidificado e a dosagem feita com o reagente Folin-Ciocalteu. A quitosana induziu o aumento da atividade das enzimas nas primeiras 24 h após o tratamento, sendo neste tempo detectada a maior atividade. Não houve atividade de fenilalanina amônia-liase, bem como acúmulo de fenóis. Finalmente, fica evidenciado que quitosana e a UV-C apresentaram efeito *in vitro* sobre *G. citricarpa*, porém somente a quitosana exibiu potencial no controle da mancha preta em laranja pós colheita.

Palavras chave: Mancha preta; Indução de resistência; Fungicidas; Harpina

ABSTRACT

Effect of chitosan and UV-C on the control of *Guignardia citricarpa* on postharvest orange

Brazil is the biggest producer and exporter of orange juice, and this is one of the most important economical activities for the country. The fruits can be affected by the citrus black spot, disease caused by the fungus *Guignardia citricarpa*, which depreciates then commercially, causes premature fall and increases the production cost. Alternative measures to the chemical control are being studied and, in this context, resistance induction can be considered. The present work had as objective evaluate the *in vitro* effects of chitosan and UV-C radiation on mycelial growth, germination and apressorium formation by *G. citricarpa* and the action of the abiotic agents on controlling the disease on postharvest oranges, under room temperature and refrigeration storage, also studying the mechanisms of resistance in the plant tissue in response to the better treatment. The chitosan concentrations were 0, 0.5, 1.0, 1.5; 2.0 and 3.0% and the UV-C doses were 0.52, 1.04, 3.13, 10.44 and 15.66 kJ.m⁻². Chitosan inhibited mycelial growth and stimulated the germination and the apressorium formation that were morphologically abnormal. UV-C did not inhibited mycelial growth, but reduced it at the highest dose used. For the *in vivo* experiments, oranges were collected, sanitized with hypochlorite and treated. Chitosan concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0% and the UV-C dose of 7 kJ m⁻² exhibited better results in 'Valência' oranges. Analyses of peel color of irradiated fruits revealed a light browning. The fungicides thiabendazole and imazalil did not control the disease in 'Pêra Rio' oranges, but fewer lesions appeared on fruits treated with the fungicides in association with chitosan, under room temperature and refrigeration. Color analysis of peel indicated yellowing and no significant differences among soluble solids, titratable acidity, pH vitamin C and ratio. In the chitosan, thiabendazole and UV-C assays, there was a better control of lesion appearing by treatment with chitosan, applied alone or in association with fungicide and UV-C, at room temperature or refrigeration. Chitosan and the harpin protein were similar on the controlling of the disease and, in comparison to the citric acid, chitosan presented better control on 'Valência' oranges. For biochemical analysis, flavedo samples were homogenized in acetate buffer, centrifuged, and the supernatant collected. The reagents used were CM-chitin-RBV, CM-Curdlan-RBB, guaiacol, catechol and L-phenylalanine for chitinase, glucanase, peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase, respectively. For phenol determination, flavedo was homogenized in acidified methanol and the evaluation was made with Folin-Ciocalteau. Chitosan increased enzyme activities in the first 24 h after treatment, with the highest activity in that time. Activity of phenylalanine ammonia-lyase was not detected, well as absent of phenolic compounds accumulation. Chitosan and UV-C exhibited *in vitro* effect on *G. citricarpa*, however, only chitosan showed potential on the control of black spot in postharvest oranges.

Key words: Black spot; Resistance induction; Fungicides; Harpin

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros, maior consumidor e exportador de suco de laranja (CITRUSFEAT, 2001; FNP, 2006). Cerca de 80% da produção é destinada à industrialização, sendo o suco produzido exportado para vários países, incluindo-se principalmente Bélgica, Países Baixos, Estados Unidos e Japão. As exportações nacionais de suco resultaram para o país aproximadamente US\$ 1 bilhão em 2004. O Brasil é o 11º exportador de frutas frescas em 2004/05, tendo exportado neste período 82 mil toneladas (FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS, 2006).

Não obstante a importância econômica e social que representa a citricultura para o país, este setor enfrenta vários problemas de natureza fitossanitária, onde se insere especialmente a mancha preta dos frutos cítricos. Esta doença se encontra na África, Ásia, Austrália e na América do Sul (Argentina, Brasil e Peru) (REIS; TIMMER; GÓES, 2006). É considerada pela União Européia uma doença quarentenária A1 por não estar presente em nenhum dos países membros. Por isso existe uma barreira fitossanitária limitando, neste sentido, as fronteiras de exportação de frutas cítricas. A revista VEJA (Especial “Agronegócio e Exportação”, de outubro de 2004, p. 63) publicou que em 2004 produtos brasileiros tiveram a qualidade questionada, dentre eles a laranja com mancha preta, e ressalta que o país precisa redobrar a vigilância e produzir mercadorias com mais qualidade, se quiser ser respeitado no mercado internacional.

A indústria do suco de laranja, a de papel e celulose e a sucro-alcooleira competem pela mesma área de produção. É possível que produtores de laranjas migrem para a produção de cana-de-açúcar ou para o eucalipto devido ao aumento da pressão de problemas fitossanitários, que ocasionam alta de 20% nos custos de produção em dólar, e à rentabilidade dos outros setores. O custo para o controle da mancha preta é avaliado em US\$ 0,46 por caixa (FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS, 2006).

Formas patogênicas e não patogênicas de *Guignardia*, agente causal da mancha preta, têm sido reconhecidas e elas diferem em taxa de crescimento, tipo da colônia, coloração, morfologia do conídio e características moleculares, que distinguem as espécies. *G. mangiferae* possui ampla gama de hospedeiros, que inclui citros, enquanto que *G. citricarpa* afeta somente espécies de *Citrus* (GLIENKE-BLANCO et al., 2002; REIS; TIMMER; GOES, 2006).

São considerados frutos com mancha preta somente aqueles que apresentam sintomas, o que exige um trabalho adequado de seleção nos galpões de embalagem. Entretanto, os sintomas

podem se expressar na fase de pós-colheita e, caso detectado apenas um fruto com sintoma, todo o lote é rechaçado no mercado internacional (TOFFANO, 2005).

Medidas de controle economicamente mais viáveis do que o controle químico convencional e efetivas no controle da mancha preta devem ser investigadas de imediato. A indução de resistência insere-se neste contexto. A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas ativadas pelo hospedeiro, após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais. A resistência pode se manifestar como uma resposta de hipersensibilidade, que resulta na morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno, ou pode incluir alterações estruturais, acúmulo de espécies ativas de oxigênio, síntese de metabólitos secundários e produção de ampla variedade de moléculas de defesa (“pathogenesis related proteins” ou proteínas-RP) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). A resistência pode ser ativada após a infecção por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos e pode apresentar duração variada e efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematóides. Entre os elicitores abióticos estão a quitosana e a radiação ultravioleta (UV-C, 254 nm) (WILSON et al., 1994).

Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito *in vitro* dos agentes quitosana e radiação UV-C sobre o crescimento micelial, germinação e formação de apressórios por *Guignardia citricarpa*, e a ação destes agentes abióticos no controle da doença em laranjas pós-colheita, sob armazenamento ambiente e refrigerado, estudando-se também os mecanismos bioquímicos de resistência no tecido vegetal (β -1,3-glucanase, quitinase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, peroxidase e fenóis totais) em resposta ao tratamento exibindo melhor eficiência.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Sintomatologia da mancha preta

Os sintomas da mancha preta, embora possam ser verificados em folhas e no pedúnculo dos frutos, são excepcionalmente raros nesses tecidos (ANAGNOSTAKIS, 1992). É uma doença quase que exclusivamente de frutos (KOTZÉ, 1981), sendo descritos seis tipos de sintomas (SPÓSITO et al, 2004), designados como falsa melanose, mancha dura, mancha preta, mancha sardenta, mancha virulenta (HERBERT, 1989) e, recentemente, a mancha trincada (GÓES et al, 2000) (Figura 1).

A mancha dura é o sintoma mais comum e típico da doença, em geral aparecendo quando o fruto inicia a maturação. Em frutos verdes, um halo amarelado aparece circundando as lesões. Em frutos maduros, um halo verde aparece ao redor das lesões que apresentam centro deprimido de cor marrom-clara ou cinza escuro e os bordos salientes de coloração marrom-escuro. No interior dessas lesões aparecem pequenas pontuações negras, que são os picnídios do fungo. A mancha sardenta aparece depois que os frutos já passaram de coloração verde para amarelada ou laranja. São levemente deprimidas e avermelhadas, que podem coalescer formando uma grande lesão ou permanecer pequenas, individualizadas (FEICHTENBERGER et al., 2005), tipicamente contendo picnídios no seu interior. São estas as lesões comuns na pós-colheita. A mancha virulenta desenvolve-se no final da safra, quando os frutos estão maduros e as temperaturas elevadas. Podem também ocorrer após a colheita, durante o transporte e o armazenamento dos frutos, sendo resultado do crescimento ou coalescência das lesões dos dois tipos dos sintomas anteriores, dando origem a grandes lesões deprimidas, de centro acinzentado e bordos salientes de coloração marrom, pardo ou vermelho-escuro. No centro da lesão aparecem os picnídios, e a casca fica necrosada na área da lesão, podendo ocasionar queda de frutos. A falsa melanose aparece em frutos ainda verdes, quatro a cinco meses após a queda das pétalas. São irregulares, ásperas e de tamanho variado, mas predominantemente pequenas, normalmente circundadas por numerosos pontos escuros, que são lesões satélites, não sendo formados picnídios. A mancha trincada aparece em frutos ainda verdes e são superficiais, irregulares, lisas e de tamanho variado, escuras ou acastanhadas. Não são produzidos picnídios e, semelhantemente à falsa melanose, não

causam a queda de frutos. Quando o fruto atinge a maturidade, a área lesionada apresenta trincas ou fissuras. Os sintomas de mancha rendilhada são lesões superficiais, sem bordo definido, textura lisa e aparecem quando os frutos estão ainda verdes (FUNDECITRUS, 2006).

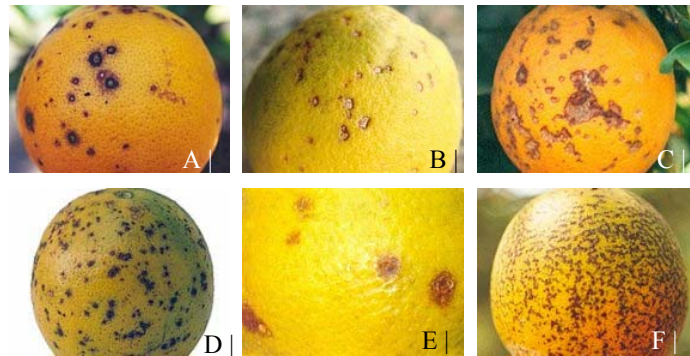


Figura 1 - Sintomas de mancha preta em frutos A- mancha dura; B- mancha sardenta; C- mancha virulenta; D- falsa melanose; E- mancha trincada; F- mancha rendilhada (FUNDECITRUS, 2006) Barras: (A,C,D,F)= 2,8 cm; (B)= 2,3 cm; (E)= 1,4 cm

De maneira geral, as lesões nos frutos restringem-se praticamente à casca (flavedo), sem atingir o albedo e, dessa forma, prejudicam a aparência dos mesmos, inviabilizando a sua comercialização para o mercado de frutas frescas (McONIE, 1967), comprometendo também a exportação, sendo esta uma doença quarentenária A1. Além de afetar a aparência dos frutos, grandes prejuízos resultam da queda precoce dos mesmos que, sob condições favoráveis, pode exceder a cerca de 80% dos frutos da planta. Com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e seus híbridos, quase todas as variedades de citros são suscetíveis (KOTZÉ, 1981; GÓES, 2001). A lima ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka), porém, não apresenta sintomas.

2.1.2 Epidemiologia da mancha preta

A fase teliomórfica do agente causal da mancha preta é conhecida como *Guignardia citricarpa*, e foi descrito por Kiely, em 1948. A fase anamórfica do patógeno é descrita como *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa. Atualmente, utiliza-se tanto esta denominação quanto a antiga [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Petrak] (SCHUTTE et al, 1997).

A mancha preta pode ser causada por duas fontes de inóculo, ou seja, duas vias de infecção: pelos picnidiósporos (KOTZÉ, 1989) ou pelos ascósporos. Os primeiros são produzidos em picnídios que se formam em lesões de folhas e frutos e emergem através de um ostíolo. São envolvidos em uma substância mucilagenosa que tem a função de protegê-los contra condições

climáticas adversas. A água, ao passar pela superfície destas estruturas solubiliza esta mucilagem carregando a suspensão até a superfície de órgãos suscetíveis, onde novas infecções podem ser iniciadas (BALDASSARI, 2001). Desta forma, os picnidiosporos são disseminados somente a curtas distâncias pela ação da água, constituindo-se assim uma importante fonte adicional de inóculo (FEICHTENBERGER et al., 2005). Já os ascósporos são produzidos apenas nas folhas caídas e em decomposição, de 40 a 180 dias depois da queda das folhas ao solo. A produção é favorecida pelas alternâncias entre os períodos de molhamento e seca das folhas, condição bastante frequente durante a estação chuvosa do ano, constituindo na principal fonte de inóculo. Podem ser carregados pelo vento, disseminando o fungo a longas distâncias, bem como serem levados por respingos de água das folhas caídas até às superfícies dos órgãos da parte baixa da copa da planta (FEICHTENBERGER et al, 1997).

Ambos os tipos de esporos germinam na superfície de órgãos suscetíveis e produzem estruturas de fixação denominadas apressórios. Uma delgada hifa de infecção é formada a partir do apressório, dando origem a uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme. Nesta forma, o micélio pode permanecer dormente por doze meses; este período pode ser interrompido quando o fruto atingir o seu tamanho final e iniciar a maturação ou quando a folha, já caída, começar a se decompor (FEICHTENBERGER et al, 2005). O patógeno, então, coloniza os tecidos mais internos, produzindo os sintomas (McONIE, 1967).

O período crítico de suscetibilidade dos frutos para mancha preta ocorre desde a fase chumbinho até cerca de seis meses após a queda das pétalas, o que corresponde, no Estado de São Paulo, ao período compreendido entre setembro e março, dependendo das variedades e condições climáticas predominantes (GÓES, 1998).

A manifestação da mancha preta é favorecida por vários fatores, dos quais o mais importante é a exposição dos órgãos infectados a intensa radiação solar e temperaturas elevadas. Plantas velhas e estressadas por várias causas são também muito mais sujeitas à doença do que plantas sadias e vigorosas (FEICHTENBERGER et al, 2005).

2.1.3 Medidas de controle da mancha preta

A recomendação do controle varia com o destino da produção. Quando destina-se ao processamento industrial para a produção de suco, o controle em campo é realizado com cobre misturado com óleo emulsionável mineral ou vegetal, usando-se quatro a cinco aplicações após a

queda das pétalas. Para frutos a serem exportados ou para o mercado de frutas *in natura*, recomenda-se produtos a base de cobre em mistura com óleo nas primeiras pulverizações, pois estes produtos podem provocar fitotoxicidade aos frutos, além de tornar mais evidentes lesões e outras manchas, de origem biótica ou abiótica. Nas demais pulverizações deve-se utilizar benzimidazóis ou estrubirulinas misturados com óleo emulsionável, de maneira alternada (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Em termos práticos o controle da mancha preta é feito através de fungicidas, sendo preconizadas duas aplicações de fungicidas cúpricos em intervalos de quatro semanas, sendo a primeira na fase de $\frac{3}{4}$ de pétalas caídas. Posteriormente tem-se o uso de fungicidas sistêmicos associados a um fungicida protetor em mistura em tanque, acrescido de óleo vegetal ou mineral. O intervalo de pulverizações é de 35 a 42 dias. Com tais procedimentos visa-se garantir um grande período de proteção dos frutos, já que esses mostram-se suscetíveis até pelo menos na 24ª semana, ou seja, de quatro a cinco meses, após a queda das pétalas (BALDASSARI, 2001).

Os benzimidazóis podem ser aplicados nos pomares até três semanas antes da colheita e em pós-colheita, no Brasil, o uso de fungicidas restringe-se ao tiabendazol e ao imazalil (FISCHER et al., 2004; AGROFIT, 2006).

2.1.4 Ativação dos mecanismos de defesa em plantas

As plantas possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos que podem contribuir para a resistência das mesmas contra fitopatógenos (PASCHOLATI et al, 1995). A resistência induzida envolve a ativação de mecanismos de resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (HAMMERSCHMIDT et al, 1997). Durante as interações hospedeiro-patógeno, o patógeno lança mão de enzimas, toxinas ou hormônios para atacar o hospedeiro, enquanto este, através de mecanismos estruturais ou bioquímicos, pré ou pós-formados, procura se defender do patógeno. Os mecanismos pós-formados apresentam importância na indução de resistência, por exemplo, através de compostos induzíveis como peroxidase, glucanase, quitinase e fenóis (PASCHOLATI, 1995).

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio de utilização de agentes externos (indutores), sendo eles bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração do genoma da planta, ocorrendo de maneira não específica, local ou sistemicamente, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa, tais como proteínas

relacionadas à patogênese. Pode apresentar duração variada e efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematóides (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A indução de resistência parece ser uma das alternativas mais viáveis a serem usadas em curto prazo, especialmente quando se pensa em substituição dos agroquímicos. Após o surgimento do Bion[®] (acibenzolar-S-metil), vários outros produtos têm sido comercializados, com capacidade de ativação de diferentes mecanismos de defesa das plantas (SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005).

A resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas ativadas pelo hospedeiro, após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Pode ser manifesta como uma resposta de hipersensibilidade, que resulta na morte celular localizada no sítio de penetração do patógeno, ou podem incluir alterações estruturais, acúmulo de espécies ativas de oxigênio, síntese de metabólitos secundários e produção de ampla variedade de moléculas de defesa (*pathogenesis related proteins* ou proteínas-RP) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Como todos os organismos eucarióticos, as células vegetais desenvolveram evolutivamente diversos sistemas de transdução de sinais que lhes permitem responder de forma específica aos estímulos externos. As proteínas MAP quinases representam elementos envolvidos na transdução de sinais eliciadores e são ativadas através de fosforilação, convertendo sinais recebidos em respostas específicas dentro da célula (ZHANG et al., 2006).

Alterações estruturais como depósito de calose e lignina resultam no fortalecimento da parede celular do hospedeiro, dificultando a entrada do patógeno ou a troca de nutrientes entre estes e a célula vegetal. Enquanto que a calose e a lignina, que são polímeros constituídos, respectivamente, de β -1,3-glucana e álcoois cinâmicos, se depositam normalmente na parede celular do hospedeiro, a papila, que é uma estrutura contendo especialmente calose e compostos fenólicos, se forma junto à parede celular vegetal no sítio de penetração do patógeno (GUZZO, 2004).

As proteínas-RP constituem-se em proteínas de plantas que se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou ataque por insetos herbívoros, bem como em

resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse. São efetivas na inibição do crescimento, multiplicação e expansão do patógeno (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999), estando localizadas no espaço intercelular, no vacúolo e/ou na parede celular vegetal, tendo sido encontradas em várias espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias. A maioria das proteínas-RP translocam-se através da membrana do retículo endoplasmáticos para o vacúolo ou espaço intercelular. São agrupadas em 17 famílias e apresentam características como baixo peso molecular, estabilidade sob altas temperaturas (60 a 70°C) e em meio ácido, ou seja, pH em torno de 2,8 (quase a totalidade das proteínas precipita nesta condição) e resistência a proteases (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

As proteínas-RP β -1,3-glucanases e quitinases são capazes de degradar respectivamente glucanas e quitina presentes nas paredes celulares de muitos fungos. As glucanases são pertencentes à família PR-2, e as quitinases à família 3, 4, 8 e 11 (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Ambas apresentam massa molecular entre 25 e 35 kDa (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). As peroxidases são proteínas-RP antioxidantes (H_2O_2 oxirredutases) capazes de catalisar grande número de reações como produção ou catálise de H_2O_2 , formação de lignina, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos (HIRAGA et al., 2001). Apresentam massa molecular de 40 kDa, sendo conhecidas como enzimas de “função dupla”, pois são capazes de gerar o que lhes servirá de substrato (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). As peroxidases de plantas são distribuídas em três classes, sendo da Classe I as peroxidases intracelulares, Classe II, as extracelulares e Classe III as peroxidases secretadas e transportadas em vacúolos. As peroxidases específicas contra fitopatógenos têm sido caracterizadas na família PR-9 das proteínas-RP (HIRAGA et al., 2001; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A enzima polifenoloxidase (PPO) catalisa a oxidação de compostos fenólicos em quinonas, que se polimerizam para pigmentos escuros denominados melanina. É inibida efetivamente pelo ácido ascórbico, mas este não age diretamente sobre a estrutura da enzima. O mecanismo de inibição envolve a redução de quinonas geradas pela PPO, ou seja, convertendo as quinonas novamente a compostos fenólicos, estando envolvida em perda de frutas e vegetais (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

Os fenóis são produzidos por células distribuídas pelo tecido vegetal, ao acaso ou em locais estratégicos e existem mais de 10.000 estruturas diferentes. São sintetizados por diferentes

rotas metabólicas e a classe mais abundante é derivada da fenilalanina. A enzima fenilalanina-amônia-liase catalisa a desaminação da L-fenilalanina para a formação do ácido *trans*-cinâmico, que constitui no primeiro passo da via dos fenilpropanóides, que resulta na produção de vários compostos de defesa de plantas, como compostos fenólicos, lignina e fitoalexinas (UMESHA, 2006). Estes compostos são compartimentalizados pois são tóxicos à célula e podem ser rapidamente oxidados.

2.1.5 Indução de resistência em pós-colheita

Um fato de relevância é o aparecimento de sintomas da mancha preta dos citros nas fases de pós-colheita. Tem-se verificado que frutos, mesmo após criteriosa seleção e tratamentos de pós-colheita, têm exibido sintomas nas fases de transporte e durante o armazenamento, no local de destino. Dessa forma, na exportação, dado o caráter quarentenário da doença, a presença de uma única lesão em um fruto amostrado implica na suspensão do desembarque de frutos existentes no navio. Como os sintomas se originam a partir de infecções quiescentes, torna-se premente inativar o fungo, visando a supressão dos sintomas.

A infecção quiescente caracteriza-se pelo período em que ocorre a inibição do desenvolvimento do patógeno, por condições fisiológicas impostas pelo hospedeiro, até que algum estágio de maturação tenha se completado. A natureza sistêmica e a expressão dos mecanismos de defesa nos tecidos da fruta, promovidas pelo uso de indutores de resistência, podem ser importantes em retardar o desenvolvimento de infecções quiescentes que, tipicamente, tornam-se ativas quando a resistência dos tecidos diminui (CAMILI; CIA; BENATO, 2005).

Dentre os métodos empregados para o controle de doenças em pós-colheita incluem-se os físicos, que consistem no uso de atmosfera modificada/controlada, tratamento térmico, radiação ionizante, radiação ultravioleta (UV-C, 254 nm); químicos, que compreendem o uso de sanificantes e fungicidas de contato ou sistêmicos; biológicos, através da utilização de organismos antagonistas aos patógenos ou seus subprodutos; e alternativos, que compreendem o uso de produtos naturais, como os indutores de resistência (BENATO, 2002).

A regulação do ambiente através do uso de câmaras frias no armazenamento e transporte de frutos beneficiados é prática importante para a redução de doenças pós-colheita. A temperatura para a conservação de frutos cítricos depende da variedade a ser armazenada. Em termos gerais, recomenda-se 10 a 12°C para pomelos, limões verdadeiros e limas, 5 a 7°C para

tangerinas e 2 a 4°C para laranjas doces, com umidade relativa do ambiente entre 90 e 95% (BENATO et al., 2001). O desverdecimento dos frutos, com aplicação de etileno, pode contribuir para a expressão de sintomas de doenças pós-colheita sendo que o armazenamento refrigerado das frutas, após o desverdecimento, é recomendável para restringir o desenvolvimento dos patógenos.

A indução de resistência é uma nova alternativa para o controle de doenças nesta fase. Tratamento térmico, fermento, radiação gama, UV-C, antagonistas e raças não-patogênicas e compostos naturais e químicos têm demonstrado resultados positivos como elicitores de resistência em produtos vegetais pós-colheita (WILSON et al., 1994).

Evidências têm mostrado que o estímulo do metabolismo secundário é uma característica típica de reação a vários tratamentos pós-colheita (BENHAMOU, 2004). Estes metabólitos secundários podem ter um importante papel inibindo diretamente o desenvolvimento do patógeno devido seu potencial antimicrobiano e indiretamente protegendo os tecidos das áreas invadidas ou adjacentes a estas, agindo como uma barreira mecânica capaz de impedir a expansão do agente fitopatogênico.

2.1.6 Quitosana

É um polímero de alta massa molecular que ocorre em artrópodes. É produzido pela desacetilação da quitina e apresenta diversas aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos. A unidade primária é o 2-deoxi-2-(acetilamino)glicose, que se une a outras unidades por ligações β -1,4, formando uma longa cadeia linear. (SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005). Pode ser usada, teoricamente, como revestimentos para frutos, devido a sua habilidade de formar um filme semipermeável, modificando a atmosfera e diminuindo a transpiração dos frutos. Além de atrasar o amadurecimento e senescência de frutos e outros vegetais, este agente abiótico mostra-se como um potente elicitador das respostas de defesa em várias plantas, protegendo-as contra a infecção por diferentes patógenos.

Quitosana também é capaz de estimular defesas estruturais em pimentões e tomates. As mais comuns envolveram o engrossamento da parede celular do hospedeiro e a formação de papilas, além de ocupar alguns espaços intercelulares com material fibrilar parcialmente impregnado com substâncias amórficas, que são presumivelmente compostos antifúngicos semelhantes a fenóis (EL GHAOUTH et al., 1994). Dentre as respostas de defesa estimuladas

pode-se destacar a atividade de quitinases, o acúmulo da fitoalexina pisatina em ervilha e de inibidores de proteases em tomate, bem como a formação de aposições na parede celular e a lignificação dos tecidos vegetais (BENHAMOU et al, 1992; WALKER-SIMMONS et al, 1983). Estudos demonstram que a aplicação de quitosana reduziu significativamente a podridão de *Botrytis cinerea* em morangos (EL GHAOUTH et al., 1992) e em uva (CAMILI, 2004). O tratamento com quitosana induziu hidrolases antifúngicas, como quitinases, β -1,3-gucanases e quitosanases em morangos, pimentões e tomates. Nos pimentões e tomates, estas enzimas permaneceram com atividade elevada por 14 dias após o tratamento (EL GHAOUTH et al., 1992).

Benhamou (2004) relata que frutos cítricos (*C. lemon* L.), tratados com quitosana com posterior inoculação com *Penicillium digitatum*, tiveram o desenvolvimento da doença marcadamente reduzido comparando-se com a testemunha não inoculada. Observações histológicas confirmaram a restrição da colonização pelo patógeno e pronunciada desorganização de sua hifa, tornando-a completamente destorcida e agregada e altamente vacuolada. A quitosana também, provavelmente, estimulou a síntese “de novo” de compostos fenólicos, bem como a deposição de lignina.

Cachos de uvas na vinha foram pulverizados com quitosana 1%, colhidos e inoculados com *B. cinerea*, ocorrendo redução na incidência e severidade da doença. Tratamentos combinando-se quitosana e UV foram sinérgicos na redução da incidência e severidade de bolor cinza (*B. cinerea*), comparando-se os tratamentos isoladamente (ROMANAZZI et al., 2006).

As propriedades antifúngicas e elicitora de defesa da quitosana apresentam possibilidades para proteção de culturas e preservação pós-colheita. Além disso, a natureza sistêmica e persistência das enzimas de defesa no tecido vegetal elicitadas pela quitosana pode assumir importância retardando o aparecimento de infecções quiescentes que tipicamente se tornam ativas quando a resistência do tecido declina (WILSON et al., 1994).

Existe comercialmente o indutor de resistência que apresenta como princípio ativo a quitosana, denominado Elexa[®], sendo que o mecanismo de ação pode assemelhar-se àquele desencadeado pelas plantas quando são atacadas por fungos. A presença de monômeros de quitina, produzidos após sua degradação sobre a superfície do tecido vegetal, gera um sinal no sítio receptor da infecção, disparando uma cadeia de reações bioquímicas (SOBRINHO,

FERREIRA, CAVALCANTI, 2005). Aparentemente, o uso de quitosana pode aumentar a vitalidade das células vegetais e a capacidade das plantas na degradação das paredes de fungos durante a infecção.

2.1.7 Radiação Ultravioleta (UV-C)

O maior volume de estudos utilizando a luz UV-C data do início dos anos 90 e provavelmente perdeu impulso devido ao surgimento de substâncias químicas com capacidade indutora, o que tornou mais fácil a manipulação e a condução dos trabalhos (SOBRINHO, FERREIRA, CAVALCANTI, 2005).

A luz UV presente na luz solar é geralmente designada UV-C, quando comprimento de onda inferior a 280 nm, UV-B, quando comprimento de onda de 280 a 320 nm e UV-A, quando comprimento de onda de 320 a 390 nm (WILSON et al., 1994). A grande maioria de pesquisas publicadas envolvendo o tratamento pós-colheita de UV-C tem utilizado o comprimento de onda de 254 nm devido, principalmente, a disponibilidade de lâmpadas comerciais (CIA, 2005). Além disso, todos os tipos de radiação podem danificar o DNA da planta e processos fisiológicos, porém baixas doses de radiação UV-C podem induzir resistência pós-colheita (WILSON, et al., 1994). A luz UV-C apresenta também a vantagem de não contaminar o produto devido a atuação somente na superfície do fruto, e não é ionizante.

A luz ultravioleta mostrou-se eficiente na indução de resistência em alguns produtos vegetais como uva, citros, maçã, pêssigo, morango e pimentões (CAMILI et al., 2005). Existem evidências que suportam a possibilidade de controle de doenças já instaladas em profundidade nos tecidos dos frutos (quiescentes), através do emprego da radiação UV-C na pós-colheita (STEVENS et al., 1998).

A redução de podridões pela UV-C pode ser devida ao efeito germicida e/ou a indução de resistência a patógenos (STEVENS et al. 1998), sendo a ação germicida devida a interferência no DNA dos microrganismos. Porém, em trabalhos com pomelos, Droby et al. (1993) afirmaram que o efeito da UV-C em reduzir o bolor verde é devido a respostas do hospedeiro mais do que pela ação germicida da radiação.

O aumento de resistência de pomelos contra o desenvolvimento de *P. digitatum* foi atribuído à indução de quitinase e β -1,3-glucanase na casca dos frutos (PORAT et al., 1999). Por sua vez, a resistência induzida pela UV-C contra este patógeno, causador do bolor verde em

citros, elicitou o acúmulo das fitoalexinas escoparone e escopoletina (RODOV et al. 1994). Doses de radiação empregadas apresentaram algum nível de controle de *B. cinerea* em uva ‘Itália’ na pós-colheita, exercendo também efeito germicida *in vitro*, retardando a germinação de esporangios, bem como o crescimento micelial (CAMILI, 2004; CAMILI et al., 2004).

A resistência induzida, especialmente a 254 nm, tem sido relacionada com a biossíntese de substâncias, principalmente de natureza fenólica e pelo aumento da atividade biossintética da fenilalanina amônia-liase (GONZALES-AGUILAR et al., 2001). A atividade de fenilalanina amônia-liase em pomelos aumentou em 24 h após o tratamento com UV e permaneceu elevada por 72 h, enquanto peroxidase atingiu máxima atividade 72 h depois do tratamento (DROBY et al., 1993). UV também elicitou o acúmulo de fitoalexina em cenoura, protegendo contra *B. cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Além de atuar como um indutor de resistência em frutos a doenças e como agente sanitizante, pode prolongar o período de armazenamento dos frutos através do atraso do amadurecimento. As podridões de *Alternaria alternata*, *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* em tomates foram efetivamente reduzidas pelas doses de 3,6 a 7,5 kJ.m⁻² de UV-C, além dos frutos permanecerem mais firmes do que a testemunha não irradiada (LIU et al., 1993). Tomates tratados com UV-C (1,3 a 4 kJ m⁻²) mantiveram a firmeza e menor taxa de mudança de coloração, o que indica atraso no amadurecimento (LIU et al., 1993). A radiação UV-C por 10 min aumentou a vida de prateleira de mangas devido à indução de compostos antifúngicos na casca (GONZALES-AGUILAR et al., 2001).

A UV pode ser inserida na linha de processamento pós-colheita de alguns produtos e também ser combinada com controle biológico e com emprego de produtos naturais (WILSON, et al., 1994).

2.1.8 Harpina

Como comentado acima, existem atualmente alguns indutores de resistência comercializados, sendo um deles o Messenger[®], que apresenta 3% de harpina em sua composição. As harpinas são proteínas de origem bacteriana que ocorrem naturalmente e estão presentes em várias espécies de bactérias fitopatogênicas. A primeira proteína harpina foi isolada de *Erwinia amylovora* e constatou-se que esta proteína induz resistência sistêmica contra várias

doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, e também contra alguns insetos herbívoros (CAPDEVILLE et al., 2003). Foi demonstrado que a harpina induz resposta de hipersensibilidade em plantas e também acelera o desenvolvimento vegetal (aumento da biomassa radicular e foliar, antecipação da maturação de frutos e aumento do número de frutos) e afeta processos fisiológicos básicos importantes para o crescimento vegetal, incluindo o aumento da atividade fotossintética e absorção de nutrientes. O Messenger[®] é facilmente degradado devido à radiação solar ou à atividade metabólica de diferentes organismos, não sendo acumulado no ambiente e não deixando resíduos nas plantas e seus produtos (EDEN BIOSCIENCE, 2002).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local

Os ensaios *in vitro* e os testes bioquímicos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP. Os testes com laranjas pós-colheita foram promovidos nas instalações do Grupo de Engenharia e Pós-colheita (GEPC), no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), em Campinas/SP.

As laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) para a realização dos experimentos foram coletadas nas fazendas Oriçanga, em Mogi Guaçu/SP, e Nova Era, em Casa Branca/SP.

2.2.2 Obtenção e cultivo do fitopatógeno

O fungo *G. citricarpa* foi isolado a partir de lesões do tipo mancha dura de frutos provenientes das fazendas de onde foram coletados e utilizados nos ensaios *in vivo*. Foram obtidos fragmentos do tecido lesionado do fruto, precedendo-se a assepsia em álcool etílico 70% por 30 s, em seguida em hipoclorito de sódio 1,5% por 60 s e, após este, os fragmentos foram lavados em água destilada esterilizada e colocados sobre papel de filtro para a retirada do excesso de umidade. Os fragmentos foram então transferidos para placas contendo meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido de oxitetraciclina (50 ug ml^{-1}), e incubados à 25°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h, até o aparecimento da colônia do fungo. As repicagens foram feitas a cada 25 dias para a manutenção dos isolados. Os isolados foram mantidos também em tubos com BDA acrescido de óleo mineral Nujol.

2.2.3 Efeito *in vitro* dos agentes abióticos sobre *G. citricarpa*

2.2.3.1 Quitosana

Para se avaliar o crescimento micelial do fungo, promoveu-se a incorporação de quitosana (tendo como veículo o ácido cítrico), da empresa CYRBE, Sumaré/SP, com meio BDA fundente (45°C em banho-maria), obtendo-se as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0% (v/v). A testemunha foi representada por placa de petri contendo somente meio BDA. Discos de micélio de 3 mm de diâmetro foram colocados nestas placas que foram mantidas à 25°C, sob luz

fluorescente com fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram realizadas a cada três dias, utilizando-se paquímetro, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial. Foram feitas cinco repetições por tratamento, delineamento inteiramente casualizado. Devido o crescimento irregular da colônia, quatro medidas de diâmetro foram realizadas.

Para a determinação da germinação e formação de apressórios, pocinhos de uma placa de ELISA receberam 40 µl a diferentes diluições da solução de quitosana (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0% v/v) e da suspensão de conídios de *G. citricarpa* (10^5 esporos ml⁻¹). A testemunha foi representada pelos pocinhos contendo suspensão de conídios em presença de água destilada. A placa foi vedada com filme de PVC transparente a fim de manter a umidade e conservada a 25°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Após este período, foram contados 100 conídios em cada pocinho, obtendo-se o resultado da germinação e formação de apressórios. Os dados foram submetidos a análise de regressão.

2.2.3.2 Radiação UV-C

Para se avaliar o crescimento micelial, placas de petri Pyrex contendo disco de micélio de *G. citricarpa* de 3 mm de diâmetro em meio BDA, retirados de uma mesma colônia, foram incubadas à 25°C por 7 h antes de serem expostas à radiação UV-C. Com taxa de fluência de 1,74 mW cm⁻² e distanciadas aproximadamente 10 cm da fonte de luz, as placas abertas com o fungo foram submetidas ao tratamento com diferentes doses de radiação (Figura 2), ou seja, 0,52; 1,04; 3,13; 10,44 e 15,66 kJ.m⁻², conforme os tempos de exposição 30 s; 1; 3; 10 e 15min, respectivamente. A testemunha foi representada pela placa isenta da exposição à radiação. As placas foram mantidas à 25°C, fotoperíodo de 12 h, medindo-se o crescimento micelial com paquímetro a cada três dias. Foram feitas cinco repetições por tratamento, sendo o delineamento inteiramente casualizado.

Com os dados obtidos calculou-se o ICM (índice de crescimento micelial), de acordo com Peres et al. (2003), através da fórmula abaixo, onde C_1 = crescimento micelial no primeiro dia e N_1 = número de dias. Os dados foram submetidos a análise de regressão.

$$ICM = C_1N_1^{-1} + C_2N_2^{-1} + \dots + C_nN_n^{-1}$$

Para se quantificar a germinação e formação de apressórios, placas de poliestireno receberam 40 µl da suspensão de conídios de *G. citricarpa* (10^5 esporos ml⁻¹) e foram submetidas a tratamento com as mesmas doses de radiação utilizadas para o crescimento micelial. A

testemunha foi representada pela placa isenta da exposição à radiação. Após o tratamento, foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 h por 24 h. Foram contados 100 conídios em cada gota, obtendo-se os resultados da germinação e formação de apressório.



Figura 2 - Câmara de exposição de materiais à luz UV-C. Os frutos ou placas de petri permaneciam distanciados aproximadamente 10 cm da fonte de luz

2.2.3.3 Quitosana, ácido cítrico e fungicidas

Para se avaliar o crescimento micelial do fungo, promoveu-se a incorporação de quitosana (tendo como veículo o ácido cítrico) com meio BDA fundente (45°C em banho-maria), obtendo-se a concentração de 1,0% (v/v). Em outro tratamento, incorporou-se em meio BDA o ácido cítrico a 2% (v/v). Foram testados também os fungicidas tiabendazol e imazalil, incorporados em meio BDA, ambos a 200 ml l⁻¹. A testemunha foi representada por placa de petri contendo somente meio BDA.

Discos de micélio de 3 mm de diâmetro foram colocados nestas placas que foram mantidas à 25°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram feitas a cada 3 dias, utilizando-se paquímetro, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial e, devido ao crescimento irregular da colônia, quatro medidas de diâmetro foram realizadas por leitura. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e uma placa de petri como unidade experimental.

2.2.4 Efeito dos agentes abióticos na proteção de laranja em condições de pós-colheita

Os experimentos *in vivo* foram elaborados de acordo com o procedimento praticado nos galpões de embalagem (Figura 3). Os frutos são pré-selecionados em campo, durante a colheita, e transportados por caminhões até os galpões. Os bins são descarregados por sistema automatizado, e os frutos são sanitizados com solução de dióxido de cloro (5 ml l^{-1}) em balsa, retornando aos bins. Estes são colocados em câmaras para desverdecimento das laranjas, ($5\text{-}10 \text{ ml l}^{-1}$ etileno, à 23°C), com circulação de ar para evitar o acúmulo de CO_2 , (95%UR), por 72 h.

Após o desverdecimento, os frutos entram novamente na linha de manuseio, sendo lavados com água, detergente neutro e sanitizados com hipoclorito de sódio 200 mg l^{-1} , enxaguados, em seguida passam por secagem e seleção manual. Os fungicidas tiabendazol e imazalil são aplicados anteriormente à aplicação de cera ou misturados a ela. Novamente, os frutos passam por secagem e são cuidadosamente selecionados manualmente, quanto à presença de defeitos ou mancha preta.

Em seguida, os frutos seguem para classificação por sistema automatizado com base na cor e calibre, sendo separados em diferentes linhas para embalagem. Os frutos são colocados em caixas de papelão, que são dispostas sobre estrados e devidamente paletizadas. O transporte é feito em contêineres refrigerados ($2\text{-}4^\circ\text{C}/95\%\text{UR}$) sobre caminhões até o porto de embarque. No porto os contêineres, são refrigerados ($2\text{-}4^\circ\text{C}/95\%\text{UR}$) e a carga é fiscalizada. Caso o mercado consumidor seja a União Européia, o transporte marítimo leva em torno de 15-20 dias.

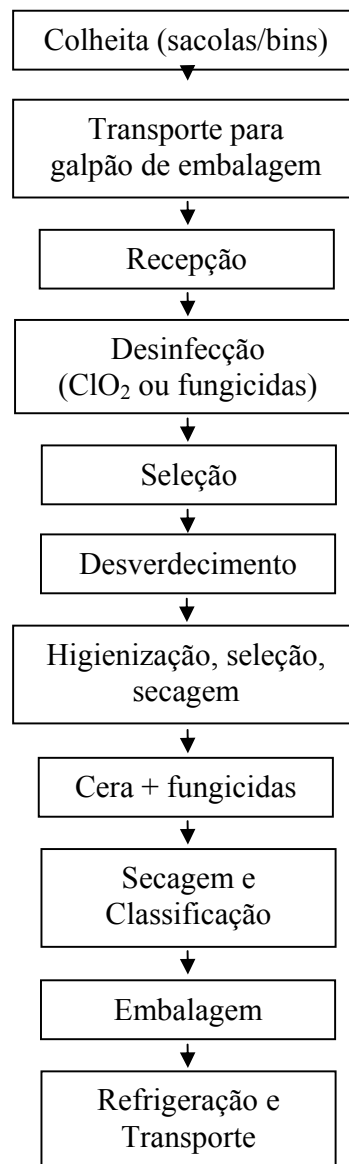


Figura 3 - Fluxograma do processamento de laranjas em pós-colheita em galpões de embalagem

2.2.4.1 Quitosana

Laranjas ‘Valência’ coletadas na Fazenda Oriçanga, foram transportadas ao Laboratório de Fitopatologia Pós-colheita do ITAL. Inicialmente, os frutos passaram por higienização, sendo lavados com água e detergente neutro e esfregados com esponja macia, para retirada da sujidade de campo; em seguida foram submetidos a sanitização com hipoclorito de sódio a 200 mg l⁻¹ por 10 min. Todos os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas provenientes de campo marcadas com caneta de retroprojektor. Posteriormente, foram tratados por imersão, com as seguintes concentrações de quitosana, diluída em água destilada: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0%

(v/v) e, após secos, acondicionados em caixas de papelão e armazenados em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$. O experimento foi desenvolvido por duas vezes: na primeira, a avaliação foi feita 5, 7 e 10 dias após o tratamento e, na segunda, 2, 6 e 8 dias após o tratamento. A avaliação da severidade foi efetuada contando-se as manchas pretas que apareceram após o acondicionamento. Os ensaios foram compostos por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela, delineamento inteiramente casualizado e analisado estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

2.2.4.2 Radiação UV-C

Laranjas ‘Valência’ passaram inicialmente por lavagem, com detergente neutro. Em seguida, foram submetidas à desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 10 min. Todos os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas pretas marcadas com caneta de retroprojektor. Posteriormente, foram expostos a radiação UV-C emitida por lâmpadas com taxa de fluência de $1,74 \text{ mW cm}^{-2}$, distanciados aproximadamente 10 cm da fonte de luz, nos tempos de 1, 3, 7, 15 e 30 min, obtendo-se, respectivamente, 0,52; 1,04; 3,13; 7,28; 15,66 e $31,20 \text{ kJ m}^{-2}$. Após os tratamentos, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e mantidos no escuro para minimizar o processo de fotoreversibilidade (STEVENSON et al., 1998) e armazenados em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$. As avaliações foram feitas aos 3, 7, 10 e 14 dias após o tratamento, contando-se as manchas que apareceram após o acondicionamento. Foram realizados dois ensaios, compostos por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela, delineamento inteiramente casualizado e com os dados foi feita análise de regressão.

A fim de se avaliar alterações na cor da casca das laranjas em decorrência dos tratamentos com UV-C, realizou-se análise da cor com auxílio do colorímetro MINOLTA CR300, sistema $L^*a^*b^*$ (Figuras 4 e 5, respectivamente), no início e final do período de armazenamento.

2.2.4.3 Quitosana, tiabendazol e imazalil

Neste experimento, frutos da variedade Pêra Rio foram utilizados devido o esgotamento de laranjas Valência nos pomares de coleta. Os frutos foram colhidos na Fazenda Oriçanga (Mogi Guaçu/SP) e expostos ao etileno ($7 \mu\text{g.ml}^{-1}$) por 72 h à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), simulando-se uma câmara de desverdecimento. Em seguida, foram lavados com água e detergente neutro e esfregados com esponja macia, sendo submetidos a sanitização com

hipoclorito de sódio a $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 10 min. Os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas provenientes de campo marcadas com caneta de retroprojektor. Os tratamentos foram representados por: 1) testemunha; 2) quitosana 2% (v/v); 3) fungicida tiabendazol (TECTO 600[®]) (800 g p.c. ou 480 g i.a./100 l⁻¹); 4) fungicida imazalil (MAGNATE 500 CE[®])(200 ml p.c ou 100 ml i.a./100 l⁻¹); 5) quitosana 2% com tiabendazol e 6) quitosana 2% com imazalil. A quitosana foi aplicada com atomizador, bem como o fungicida tiabendazol. Por sua vez, o imazalil foi aplicado por imersão, permanecendo os frutos na solução por 2 min. Nos tratamentos em conjunto, os fungicidas foram aplicados anteriormente à quitosana.

Após secos, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e armazenados em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{UR}$, sendo avaliados após sete dias. A avaliação da severidade foi efetuada contando-se as manchas pretas que apareceram após o acondicionamento.

Outro lote de laranjas foi submetido aos mesmos tratamentos e armazenado em câmara à $3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/90\text{-}95\% \text{UR}$, sendo avaliado após 21 dias. A seguir, foi feita a transferência para a câmara de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{UR}$, onde o lote permaneceu por mais cinco dias, sendo então avaliado, simulando assim o processo de exportação dos frutos.

O ensaio foi composto por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela, delineamento inteiramente casualizado e analisado estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram feitas análises físico-químicas dos frutos, avaliando-se a cor da casca das laranjas tratadas, sendo feitas três leituras utilizando-se o colorímetro MINOLTA CR 300, com sistema $L^* a^* b^*$ (Figuras 4 e 5), onde L^* =luminosidade; a^* = verde(-) para vermelho(+); b^* = azul (-) para amarelo(+).

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado no suco da fruta, sendo cada amostra composta por dois frutos, utilizando-se refratômetro manual, marca Atago, com escala 0 a 32 °Brix (Figura 4).

O pH foi avaliado em pHmetro Micronal B-274. A acidez titulável foi determinada nas amostras anteriormente preparadas para a determinação do pH, através da titulação com NaOH (0,5 N) até pH 8,1 (referente ao pH de mudança de coloração do indicador fenolftaleína). O resultado foi expresso em g ácido cítrico 100 g^{-1} de amostra. A vitamina C foi quantificada através da determinação de ácido ascórbico por método de titulação com 2,6-diclorobenzenoindofenol (DCFI) à 0,2% (p/v). O método baseia-se na redução do DCFI pelo

ácido ascórbico, onde o ponto final de titulação é detectado pela viragem da solução de incolor para rosa. Para se evitar a perda de vitamina C, a extração das amostras foi feita com solução de ácido oxálico 1% (p/v). Os resultados foram expressos em mg ác. ascórbico 100 g^{-1} (CARVALHO et al., 1990).

O *ratio*, índice utilizado para determinar o estágio de maturação, foi calculado através da relação entre teor de sólidos solúveis e acidez titulável.



Figura 4 - A) Colorímetro MINOLTA CR 300; B) Refratrômetro Manual Atago

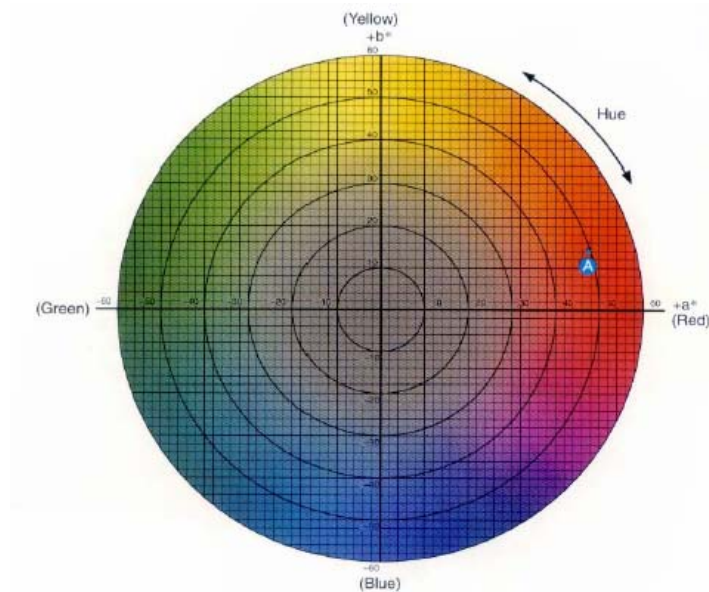


Figura 5- Sistema $L^*a^*b^*$, utilizado para a análise da cor da casca dos frutos

2.2.4.4 Quitosana, UV-C e tiabendazol

Frutos da variedade Valência, coletados na Fazenda Nova Era foram transportados ao Laboratório de Fitopatologia Pós-colheita do ITAL, onde foram lavados com água e detergente neutro e esfregados com uma esponja macia, para retirada da sujidade de campo. Em seguida

foram submetidos a sanitização com hipoclorito de sódio a $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ por 10 min. Todos os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas provenientes de campo marcadas com caneta de retroprojeter. Os tratamentos foram representados por: 1) testemunha; 2) fungicida tiabendazol a $800 \text{ g p.c. } 100 \text{ l}^{-1}$; 3) quitosana 2% (v/v); 4) luz UV-C por 7 min ou $7,28 \text{ kJ m}^{-2}$; 5) fungicida + quitosana; 6) fungicida + quitosana + UV-C; 7) quitosana + UV-C. A quitosana foi aplicada posteriormente ao fungicida, ambos por imersão.

Após secagem, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e armazenados em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$, sendo avaliados após 5, 7 e 10 dias. Outro lote de laranjas, submetido aos mesmos tratamentos, foi armazenado em câmara à $3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/90\text{-}95\% \text{ UR}$, sendo avaliado aos 15 e 21 dias. Após este período, transferiu-se o lote para câmara de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$, onde o mesmo permaneceu por mais cinco dias, sendo avaliado aos 2 e 5 dias, simulando assim o processo de exportação dos frutos cítricos. A avaliação da severidade foi efetuada contando-se as manchas pretas que apareceram após o acondicionamento.

O ensaio teve delineamento inteiramente casualizado, composto por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela. As médias dos resultados foram analisadas estatisticamente pelo teste Tukey, à 5% de probabilidade.

2.2.4.5 Quitosana e proteína harpina

Laranjas ‘Valência’, coletadas na Fazenda Oriçanga, foram transportadas para o ITAL, onde foram lavadas e sanitizadas. Todos os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas pretas marcadas com caneta de retroprojeter. Em seguida, os frutos foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1) testemunha; 2) quitosana 2% (v/v); 3) proteína harpina (Messenger[®]) 2 mg ml^{-1} ; 4) proteína harpina seguida de quitosana. A quitosana foi aplicada por imersão e o indutor de resistência harpina por aspersão. O produto Messenger[®] foi cedido pela PqC. Dra. Sylvia Dias Guzzo (Instituto Biológico de São Paulo), previamente testado *in vitro* no controle de *G. citricarpa*.

Após secagem, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e armazenados em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$, sendo avaliados após 12 dias. Outro lote de laranjas, submetido aos mesmos tratamentos, foi armazenado em câmara à $3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/90\text{-}95\% \text{ UR}$, sendo avaliado no 21º dia. Neste dia, foi feita a transferência do lote para a câmara de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\% \text{ UR}$, onde o mesmo permaneceu por mais cinco dias, sendo ao término deste período avaliado, simulando

assim o processo de exportação dos frutos. A avaliação da severidade foi efetuada contando-se as manchas pretas que apareceram após o acondicionamento.

O ensaio foi composto por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela, com delineamento inteiramente casualizado e as médias dos resultados foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

2.2.4.6 Quitosana e ácido cítrico

Laranjas ‘Valência’, coletadas na Fazenda Oriçanga, foram transportadas ao ITAL, onde foram lavadas e sanitizadas. Todos os frutos estavam naturalmente infectados e tiveram as manchas pretas marcadas com caneta de retroprojeter. Os tratamentos foram representados pela testemunha, ou seja, frutos somente lavados e sanitizados; quitosana 2% (SIGMA[®], diluída em ácido cítrico 1M) e ácido cítrico 1 M. Após a secagem, os frutos foram acondicionados em caixas de papelão e armazenados em câmara a 25°C±1°C/75-85% UR, avaliando-se a severidade após 12 dias contando-se as manchas pretas que apareceram após o acondicionamento. O ensaio foi composto por cinco repetições por tratamento e oito frutos por parcela, com delineamento inteiramente casualizado e as médias dos resultados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

2.2.5 Análises bioquímicas

2.2.5.1 Obtenção dos extratos para determinação da atividade de enzimas

As amostras de cascas (1 g) foram homogeneizadas mecanicamente em almofariz de porcelana na presença de 4,0 ml de tampão acetato 100 mM (pH 5,0) (tampão de extração), com posterior centrifugação (20.000 g / 25 min, a 4°C). Os sobrenadantes foram coletados e a fração utilizada para se avaliar a atividade das enzimas peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

2.2.5.2 Atividade de quitinase

Para a determinação espectrofotométrica da quitinase foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilquitina-remazol violeta brilhante (CM-chitin-RBV), a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (STANGARLIN et al., 2000). O método

baseia-se na hidrólise enzimática do polímero solúvel carboximetilquitina ligado covalentemente ao corante remazol violeta brilhante. As quitinases hidrolisam o polímero liberando oligômeros de quitina marcados com o corante. O polímero não hidrolisado é precipitado pela acidulação do meio de reação e pode ser eliminado por centrifugação, enquanto que os oligômeros menores permanecem em solução e após a centrifugação conferem ao sobrenadante uma coloração violeta. A intensidade de coloração é quantificada em espectrofotômetro e utilizada para medir a atividade da quitinase (WIRTH; WOLF, 1992).

Para tanto, 40 μl do extrato protéico foi misturado com 810 μl do mesmo tampão de extração e 150 μl de “CM-chitin-RBV” (2,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após submetido a banho-maria por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 μl de solução de HCl 1,0 M. As amostras foram colocadas em congelador por 10 min e, em seguida centrifugadas a 10.000 $g / 5$ min, a 4°C. A absorvância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância/min/ mg de proteína, descontando-se os valores de absorvância do controle (850 μl de tampão de extração + 150 μl de “CM-chitin-RBV”).

2.2.5.3 Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade enzimática da β -1,3-glucanase foi determinada através da reação da enzima com o substrato carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (Cm-Curdlan-RBB), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1992), que baseia-se na hidrólise enzimática do polímero solúvel carboximetilcurdlan (β -1,3-glucana carboximetilada) ligado covalentemente ao corante remazol azul brilhante. Glucanases hidrolisam o polímero liberando oligômeros de glucana marcados com o corante. A adição de ácido ao meio de reação interrompe a ação enzimática e promove a precipitação do polímero não degradado, o qual é removido por centrifugação. Os fragmentos menores, que se constituem no produto da reação enzimática, permanecem em solução e conferem uma coloração azul ao sobrenadante. A intensidade de coloração é quantificada em espectrofotômetro e utilizada para medir a atividade da glucanase.

Para tanto 40 μl do extrato protéico foi misturado com 760 μl do mesmo tampão de extração e 200 μl de “CM-Curdlan-RBB” (2,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Após submetido a banho-maria por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 μl de solução de HCl 1,0 M. As amostras foram colocadas em congelador por 10 min e, em seguida centrifugadas a 10.000 $g / 5$

min, a 4°C. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância/min/ mg de proteína, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µl de tampão de extração + 200 µl de “CM-Curdlan-RBB”).

2.2.5.4 Atividade de polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase

A atividade das polifenoloxidasas (PPO) foi determinada usando-se como básica a técnica de Duangmal & Apenten, 1999. O ensaio consiste em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima em estudo. O substrato foi composto por catecol na concentração de 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM, (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando 900 µl do substrato e 100 µL do extrato enzimático. A temperatura de reação foi de 30°C, sendo as leituras em espectrofotômetro (420 nm) realizadas de forma direta por um período de 2 min. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PFO sendo que uma unidade de PFO foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por mg de proteína total.

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada mensurando-se espectrofotometricamente a produção de ácido *trans*-cinâmico a partir de L-fenilalanina. A reação constituiu-se na mistura de 20 µl da amostra, 480 µl de tampão TRIS-HCl 25 mM (pH 8,8) e 50 µl de L-fenilalanina 50 mM. O controle foi isento do substrato. Os tubos de reação permaneceram por 2 h em banho-maria a 40°C e a reação foi paralisada através da adição de 60 µl de HCl 5 M. A leitura foi feita a 290 nm (UMESHA, 2006).

2.2.5.5 Atividade de peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada à 30°C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO & PASCHOLATI, 1999). A mistura da reação deu-se com 25 µl do extrato protéico e 2,97 ml de uma solução com 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). Na cubeta de referência havia 3 mL da solução com 250 µl de guaiacol e

306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância/ min/ mg proteína).

2.2.5.6 Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada nos extratos de cascas das laranjas controle ou tratadas com quitosana, obtidos após diferentes intervalos de tempo do tratamento com o indutor, ou seja, 0, 24, 48 e 72 h. As amostras de cascas (1 g) foram homogeneizadas mecanicamente em almofariz de porcelana na presença de 4,0 ml de tampão acetato 100 mM (pH 5,0) (tampão de extração), com posterior centrifugação (20.000 g / 25 min, a 4°C). Os sobrenadantes foram coletados e a fração utilizada para se avaliar o conteúdo protéico. A quantificação foi feita pelo método descrito por Bradford (1976), a 595 nm, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Para cada tempo, havia 5 repetições.

2.2.5.7 Dosagem de fenóis totais

Em tubos de ensaio, contendo 10 ml de metanol acidificado (HCl 0,1 %), foram colocadas as amostras de tecido vegetal (1 g), sendo as mesmas homogeneizadas por 1 min e filtradas através de papel de filtro Whatman nº 40. O filtrado de cada amostra foi submetido a evaporação (40 °C) e o resíduo suspenso em 4 mL de água destilada. A seguir, foram adicionados 2 ml de hexana à amostra, seguido de agitação vigorosa, sendo após a mesma retirada com o auxílio de pipeta. O volume final foi completado para 5 ml com água destilada, do qual foi separada uma alíquota de 25 µl que será adicionada a 3 ml de solução 2% de Na₂CO₃, preparada no momento da dosagem. Finalmente foi acrescentado 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu 2N (1:1; v/v), sob agitação. Decorridos 30 min, a absorbância das amostras foi determinada a 750 nm e os resultados expressos como equivalentes mg ácido clorogênico / grama de tecido fresco (HOTO & PASCHOLATI, 2000).

2.3 Resultados

2.3.1 Efeito *in vitro* dos agentes abióticos sobre *G. citricarpa*

2.3.1.1 Quitosana

A quitosana exerceu influência sobre o desenvolvimento do fungo, mas de maneira não dependente da dose, visto que todas as concentrações inibiram completamente o crescimento micelial de *G. citricarpa*. Em meio BDA, utilizado como controle positivo, o patógeno apresentou crescimento regular e constante, enquanto que, em meio contendo quitosana não ocorreu crescimento micelial em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 6). O ensaio foi conduzido duas vezes, ocorrendo resultados similares dos resultados.

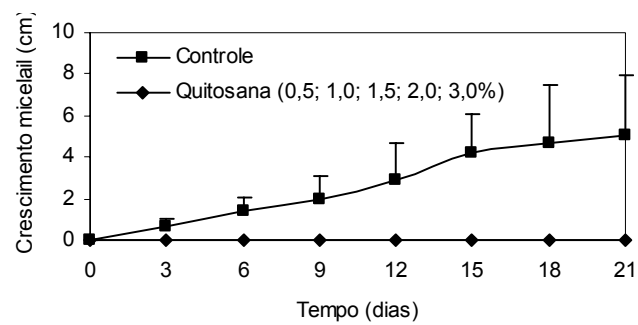


Figura 6 - Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*. Não houve crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas, ou seja, 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0% v/v. Média \pm Desvio Padrão

A quitosana estimulou a germinação dos esporos e a formação de apressórios pelo fungo em relação ao controle (Figura 7). No entanto, os esporos germinados em presença da solução de quitosana em qualquer concentração utilizada sofreram deformação no seu tubo germinativo, bem como no apressório formado, enquanto que os esporos germinados em presença da água apresentaram morfologia normal (Figura 8). O ensaio foi conduzido duas vezes, ocorrendo resultados similares.

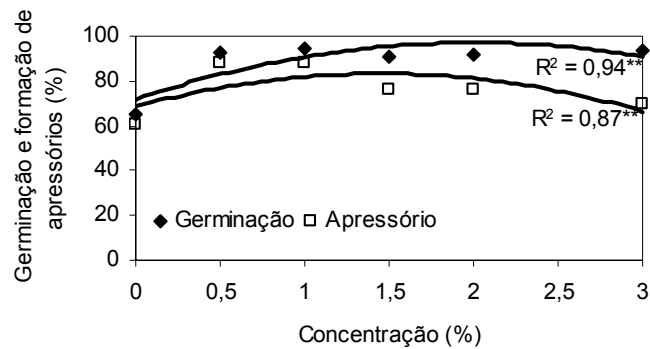


Figura 7 - Efeito da quitosana (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0%) sobre a germinação e formação de apressórios por *Guignardia citricarpa*. **Significativo a 1% de probabilidade. Equações em ANEXO

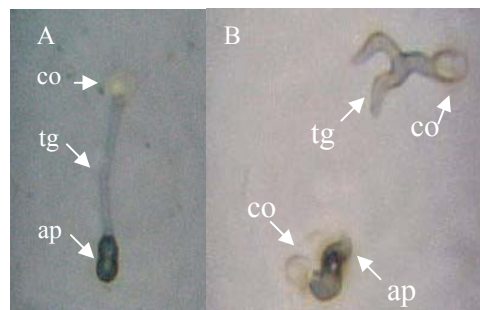


Figura 8 - Ilustração dos esporos germinados e apressórios de *G. citricarpa*. A- Controle (água destilada); B- Quitosana (2% v/v). Observação em microscópio com aumento de 400 X. ap= apressório; tg= tubo germinativo; co= conídio

2.3.1.2 Radiação UV-C

Comparando-se os resultados obtidos da avaliação do crescimento micelial de *G. citricarpa* expostos à radiação UV-C, não se observa efeito significativo entre os variados tempos de exposição (Figura 9). O menor crescimento ocorreu na maior dose de radiação aplicada, ou seja, de 15,66 kJ m⁻² (Figura 10). Na primeira avaliação efetuada, feita aos três dias após o tratamento, observou-se desenvolvimento de micélio da testemunha não irradiada adiantado com relação aos outros tratamentos. Na segunda avaliação, feita ao sexto dia após o tratamento, observou-se um ralo crescimento micelial do fungo em todas as placas expostas à UV-C. A testemunha, por sua vez, apresentava micélio melanizado, típico da colônia deste fungo, enquanto o micélio contido nas placas expostas à radiação apresentava-se branco e cotonoso. Nas outras avaliações, não foi observada nenhuma alteração, ou seja, aparentemente o fungo recuperou o seu crescimento normal.

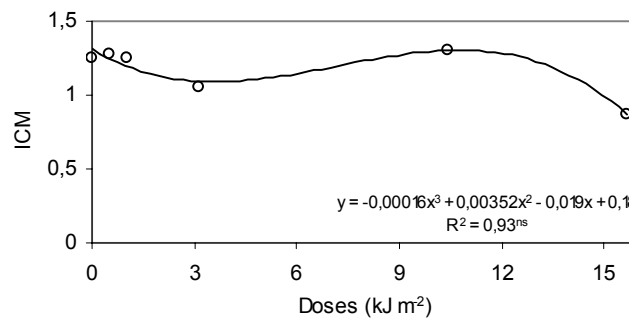


Figura 9 - Índice de crescimento micelial (ICM) de *Guignardia citricarpa* cultivado em meio BDA e exposto a diferentes doses de radiação por UV-C. ^{ns}não significativo

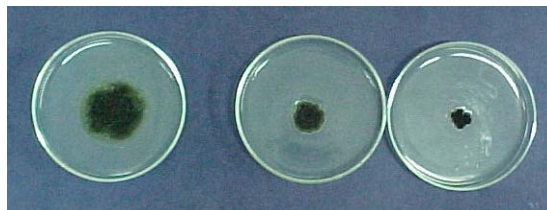


Figura 10 - Comparação do crescimento micelial do fungo *Guignardia citricarpa* entre a testemunha (à esquerda) e a maior dose de exposição à UV-C, ou seja, 15,66 kJ m⁻², representado pelas duas placas à direita

Com relação à germinação e formação de apressórios pelo fungo (Figura 11), observa-se redução de maneira dependente da dose. No entanto, não há deformação do tubo germinativo e formação irregular do apressórios nos esporos irradiados, como ocorreu com a quitosana.

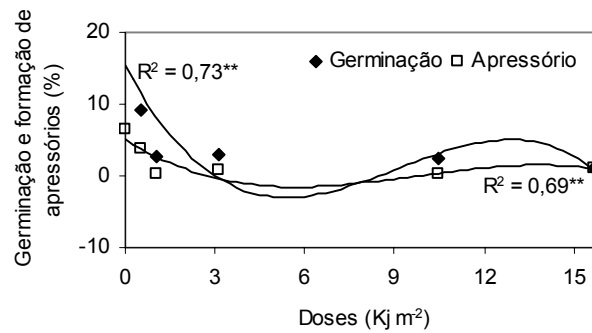


Figura 11 - Efeito de radiação UV-C (0; 0,52; 1,04; 3,13; 10,44; 15,66 kJ m⁻²) sobre a germinação e formação de apressórios por *Guignardia citricarpa*. **Significativo a 1% de probabilidade. Equações em ANEXO

2.3.1.3 Quitosana, ácido cítrico e fungicidas

O efeito da quitosana, ácido cítrico e dos fungicidas tiabendazol e imazalil podem ser observados na Figura 12. Todos os tratamentos apresentaram inibição no crescimento com relação à testemunha. A quitosana (1% v/v) e o ácido cítrico (2% v/v) inibiram completamente o crescimento micelial do fungo.

Observa-se também na Figura 12 que, entre os fungicidas, o imazalil foi menos eficiente em comparação com o tiabendazol. A completa inibição do fungo pelos tratamentos quitosana e ácido cítrico, bem como, a inibição ocasionada pelos fungicidas também pode ser observada na Figura 13.

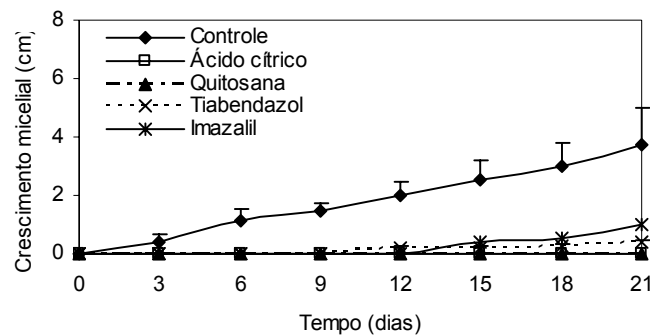


Figura 12 - Efeito da quitosana 1% (v/v), ácido cítrico 2% (v/v), fungicidas tiabendazol e imazalil, ambos a 200 mg l⁻¹, sobre o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*. Controle representado pelo meio BDA. Média ± Desvio Padrão

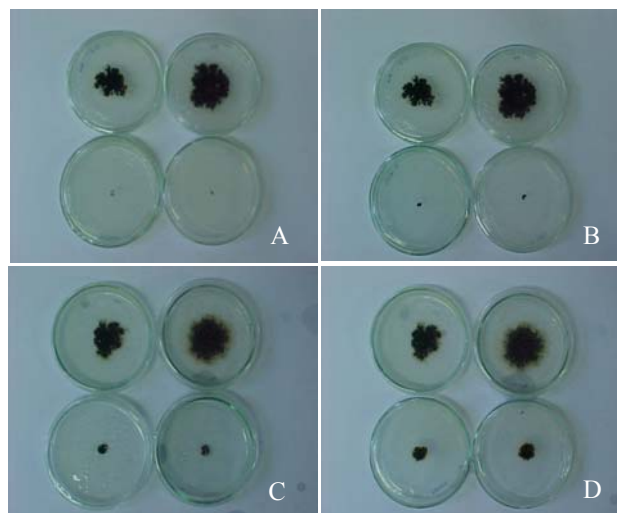


Figura 13 - Ilustração do crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*. A- quitosana; B- ácido cítrico; C- tiabendazol; D- imazalil. Nas fotos, as placas superiores representam os controles (meio BDA), e as placas inferiores os respectivos tratamentos

2.3.2 Efeito dos agentes abióticos na proteção de laranja pós-colheita

2.3.2.1 Quitosana

No primeiro ensaio, realizado em agosto de 2004 (Figura 14) não houve efeito significativo das concentrações de quitosana durante todo o período de armazenamento. No entanto, observa-se que as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0% de quitosana apresentaram melhor controle da doença. No segundo ensaio, realizado em setembro de 2004 (Figura 15), não houve efeito significativo entre as concentrações utilizadas até o segundo dia de avaliação. No entanto observou-se efeito significativo das concentrações de quitosana no 6º e 8º dia de avaliação indicando que o surgimento de novas lesões ocorreu de maneira dependente das concentrações. A concentração de 1,5% de quitosana resultou em melhor controle do aparecimento de novas lesões de mancha preta em frutos cítricos no segundo ensaio. Estes ensaios foram considerados preliminares, procurando-se comparar as concentrações de quitosana para que fosse eleita uma delas para a continuidade do trabalho. A concentração de 2% (v/v) foi escolhida por ter se mostrado constante no controle do aparecimento das lesões ao longo dos dias determinados para as avaliações.

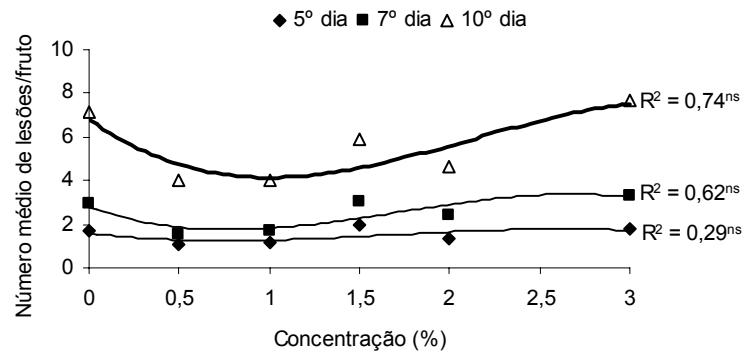


Figura 14 - Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas 'Valência', avaliadas ao 3º, 7º e 10º após o tratamento com diferentes concentrações de quitosana e armazenados a 25°C/80% UR (primeiro experimento). ^{ns} não significativo. Equações em ANEXO

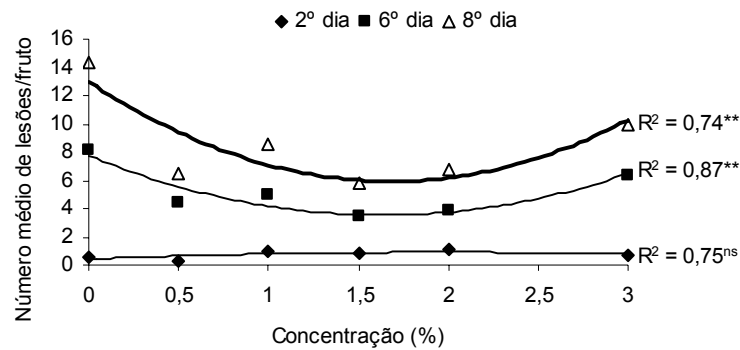


Figura 15 - Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas 'Valência', avaliadas ao 2º, 6º e 8º após o tratamento com diferentes concentrações de quitosana e armazenados a 25°C/80% UR (segundo experimento). ^{**}Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Equações em ANEXO

2.3.2.2 Radiação UV-C

Nas Figuras 19 e 20, encontram-se demonstrados os efeitos da radiação UV-C sobre o desenvolvimento de novas lesões por *G. citricarpa* em laranjas ‘Valência’, avaliadas no 3º, 7º, 10º e 14º dia após o tratamento. No primeiro experimento (Figura 16), nota-se que nas avaliações feitas no 7º e 10º dia após o tratamentos, as doses não exerceram efeito significativo sobre o surgimento de novas lesões, ou seja, não houve estímulo de resposta de defesa nos frutos que pudesse atuar no controle do patógeno, reduzindo a incidência da doença. Nas avaliações efetuadas no 3º e no 14º dia (último dia de armazenamento), houve efeito significativo para o surgimento de novas lesões. Observa-se o efeito das doses horméticas, ou seja, a redução na resistência dos frutos em doses baixas ou acima do ideal, justificando maiores índices de doença nas doses mais altas (aproximadamente 30 kJ m⁻²). No segundo experimento (Figura 17), nota-se que houve efeito significativo nas avaliações efetuadas no 3º e no 7º dia após o tratamento com a radiação UV-C. Nas avaliações feitas no 10 e no 14º dia, não houve efeito significativo. Estes ensaios foram considerados preliminares, procurando-se comparar as doses de radiação UV-C para que fosse eleita uma delas para a continuidade do trabalho. A dose de 7,28 kJ m⁻² foi escolhida para a continuidade do trabalho.

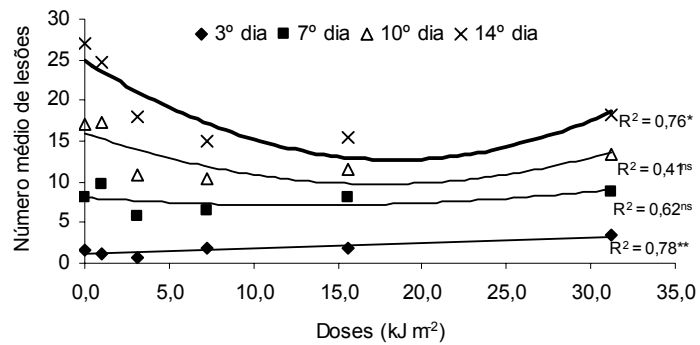


Figura 16 - Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas ‘Valência’, avaliadas ao 3º, 7º, 10º e 14º após o tratamento com a radiação UV-C e armazenados a 25°C/80% UR (primeiro experimento) *Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns}não significativo. Equações em ANEXO

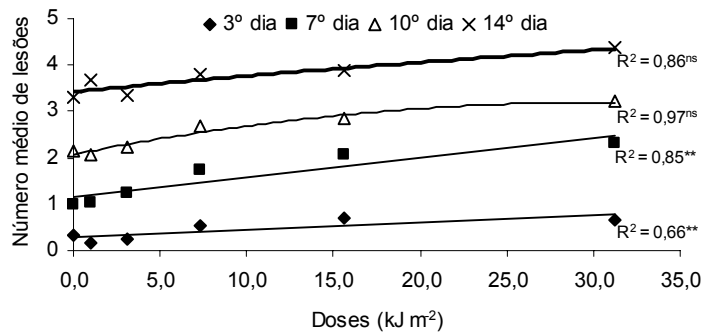


Figura 17 - Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas ‘Valência’, avaliadas ao 3º, 7º, 10º e 14º após o tratamento com a radiação UV-C e armazenados a 25°C/80% UR (segundo experimento). *Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade; ^{ns}não significativo. Equações em ANEXO

Os resultados obtidos para cor de casca dos frutos utilizados no primeiro experimento com as diferentes doses de radiação, indicam que houve diminuição dos valores L^* (luminosidade) com o aumento da dose de radiação, em comparação com a testemunha (Tabela 1). Houve diferença estatística entre os valores, sendo o maior para a testemunha e o menor para a dose de $31,2 \text{ kJ m}^{-2}$. Os valores de a^* aumentaram e os valores de b^* diminuíram nas cascas dos frutos do primeiro experimento. Não houve diferença estatística para os valores de a^* e sim para os valores de b^* , sendo o maior para a testemunha e o menor para a dose de $31,2 \text{ kJ m}^{-2}$. Constatando-se que a testemunha ficou levemente mais amarelada, enquanto as altas doses de UV-C acarretaram leve escurecimento da casca dos frutos, em decorrência da aplicação de luz UV-C.

Os resultados obtidos para cor dos frutos utilizados no segundo experimento com as diferentes doses de radiação indicam que, como ocorreu no primeiro experimento, houve diminuição dos valores L^* conforme se aumenta a dose de radiação, em comparação com a testemunha (Tabela 2), sendo, assim, o valor da testemunha maior e o valor referente à dose de $31,2 \text{ kJ m}^{-2}$ o menor. Os valores de a^* mantiveram-se semelhantes entre as doses de radiação e a testemunha não irradiada, porém foram todos os valores maiores que o obtido no dia da coleta, indicando que as cascas dos frutos perderam um pouco da sua coloração esverdeada. Não houve diferença estatística entre os valores de a^* . Os valores de b^* diminuíram nas cascas dos frutos do segundo experimento, como ocorreu no primeiro, os frutos sofreram leve escurecimento (ou bronzeamento).

Tabela 1 - Cor de casca de laranjas ‘Valência’ tratados com diferentes doses de radiação UV-C, armazenadas a 25°C/ 80%UR e avaliadas 14 dias após o tratamento (primeiro experimento)

Tratamentos	L ^{x,y}	a ^{x,y}	b ^{x,y}
Dia da coleta	69,36	-5,03	73,38
Testemunha	72,54 a	-2,59 a	79,73 a
1,04 kJ m ⁻²	72,67 a	-1,07 a	79,25 a
3,13 kJ m ⁻²	69,99 ab	-0,65 a	75,31 ab
7,28 kJ m ⁻²	68,58 b	-0,43 a	73,57 b
15,66 kJ m ⁻²	67,69 b	1,34 a	72,59 b
31,2 kJ m ⁻²	67,14 b	2,32 a	72,09 b
C.V. (%)	3,25	nd*	5,52

^yMédia de dez frutos por tratamento.

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

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

*Não determinado

Tabela 2 - Cor de casca de laranjas ‘Valência’ tratadas com diferentes doses de radiação UV-C, armazenadas a 25°C/ 80%UR, avaliadas 14 dias após o tratamento (segundo experimento)

Tratamentos	L ^{x,y}	a ^{x,y}	b ^{x,y}
Dia da coleta	71,41	-0,24	77,19
Testemunha	72,08 a	6,17 a	80,24 a
1,04 kJ m ⁻²	71,93 a	4,46 a	79,76 a
3,13 kJ m ⁻²	69,06 b	5,75 a	75,02 b
7,28 kJ m ⁻²	68,64 b	5,25 a	73,61 b
15,66 kJ m ⁻²	67,73 b	6,54 a	73,65 b
31,2 kJ m ⁻²	67,39 b	4,35 a	73,61 b
C.V. (%)	2,66	74,93	4,69

^yMédia de dez frutos por tratamento.

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

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.3.2.3 Quitosana, tiabendazol e imazalil

Neste experimento, realizado em novembro de 2004, foram utilizadas laranjas da variedade Pêra Rio devido a não disponibilidade da variedade Valência nos pomares de coleta. Os tratamentos foram acondicionados na câmara a 25°C e avaliados após sete dias (Figura 18). Não houve diferença estatística entre os resultados observados nos frutos tratados com a solução de quitosana na concentração de 2% (v/v), de fungicida tiabendazol e de imazalil. Estes tratamentos diminuíram o aparecimento de novas lesões em comparação com a testemunha. Os fungicidas não controlaram o aparecimento de novas lesões. Observou-se um melhor desempenho no controle quando estes fungicidas foram aplicados em associação com a quitosana.

Observa-se que os tratamentos que permaneceram na câmara de 3°C±1°C/90-95% UR durante 21 dias (Figuras 19 e 20) apresentaram número reduzido de manchas devido à refrigeração, com exceção do tratamento representado pelo imazalil. No entanto, quando se utilizou este fungicida juntamente com a quitosana, controle mais efetivo da doença é obtido.

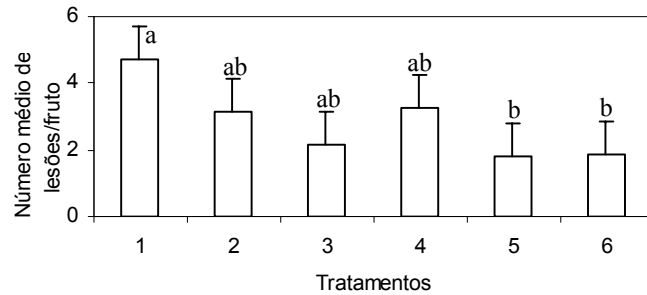


Figura 18- Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas ‘Pêra Rio’ 7 dias após o tratamento, mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR. As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Tratamentos: 1- testemunha; 2- quitosana; 3- tiabendazol; 4- imazalil; 5- tiabendazol+quitosana; 6- imazalil+quitosana

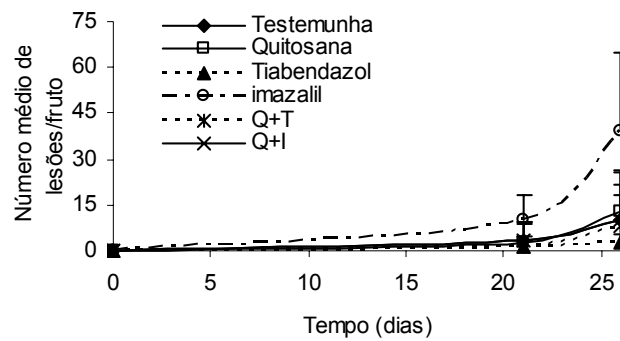


Figura 19 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Pêra Rio’ 26 dias após o tratamento. Os frutos permaneceram em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por cinco dias e foram novamente avaliados. As barras representam a média \pm desvio padrão. Q+T=Quitosana+Tiabendazol; Q+I= Quitosana + Imazalil

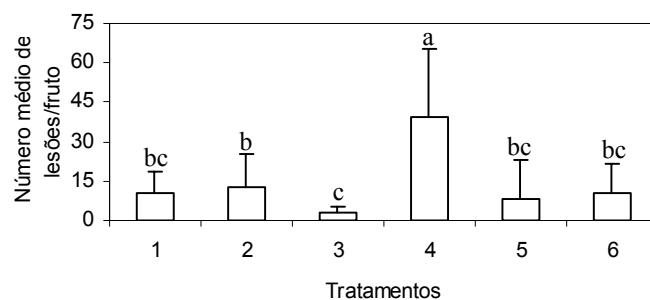


Figura 20- Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Pêra Rio’ 26 dias após o tratamento. Os frutos permaneceram em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por cinco dias e foram avaliados. As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Tratamentos: 1- testemunha; 2- quitosana; 3- tiabendazol; 4- imazalil; 5- tiabendazol+quitosana; 6- imazalil+quitosana

Após sete dias de armazenamento em temperatura ambiente (Tabela 3), ocorreu aumento da luminosidade e dos valores de a^* em todos os tratamentos em comparação com o dia da coleta dos frutos. No entanto, somente o tratamento com quitosana foi estatisticamente diferente dos tratamentos representados pelos fungicidas e igual à testemunha para L^* . Para a^* observa-se diferença estatística entre a quitosana e ambos os fungicidas. Porém quando os fungicidas foram aplicados em conjunto com a quitosana, estes tratamentos não diferiram da quitosana aplicada isoladamente. Frutos tratados com o fungicida tiabendazol e com a quitosana apresentaram menores valores do parâmetro b^* e foram os únicos tratamentos que diferiram estatisticamente da testemunha.

Após 21 dias de armazenamento sob refrigeração (Tabela 4) ocorreu aumento da luminosidade em todos os tratamentos em comparação com o dia da coleta dos frutos, não havendo diferença significativa entre os mesmos. De forma semelhante, os valores de cromaticidade também aumentaram. Novamente, como observado após 7 dias de armazenamento sob temperatura ambiente, frutos tratados com o fungicida tiabendazol apresentaram o menor valor de b^* .

Após 26 dias de armazenamento (Tabela 5), novamente ocorreu aumento da luminosidade para todos os tratamentos em comparação com o dia da coleta dos frutos. Os valores de cromaticidade também aumentaram, constatando-se que frutos tratados com o tiabendazol apresentaram menor valor de b^* . As diferenças observadas quanto aos valores de b^* para os frutos tratados com o tiabendazol pode ser devido ao aspecto esbranquiçado deixado pelo produto na superfície do fruto.

Tabela 3 - Cor de casca de laranjas 'Pêra Rio' tratadas com quitosana e fungicidas, avaliados 7 dias após o armazenamento a 25° C/80% UR

Tratamentos	L ^{y,x}	a ^{y,x}	b ^{y,x}
Dia da coleta	54,36	-20,17	39,87
Testemunha	64,92 ab	-10,20 a	57,20 a
Quitosana	59,15 b	-18,10 c	46,11 bc
Tiabendazol	66,35 a	-10,83 a	38,07 c
Imazalil	65,16 a	-11,54 ab	56,53 a
Q + T ¹	63,96 ab	-13,90 abc	50,23 ab
Q + I ²	61,86 ab	-17,66 bc	48,67 ab
C.V. (%)	7,04	-34,39	14,40

^yMédia de dez frutos por tratamento.

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

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

Tabela 4 - Cor de casca de laranjas 'Pêra Rio' tratadas com quitosana e fungicidas, avaliados 21 dias após o armazenamento a 3° C/90% UR.

Tratamentos	L ^{y,x}	a ^{y,x}	b ^{y,x}
Dia da coleta	54,36	-20,17	39,87
Testemunha	59,41 a	-18,20 ab	51,70 a
Quitosana	57,15 a	-18,76 b	50,19 ab
Tiabendazol	56,87 a	-18,51 b	43,13 b
Imazalil	63,29 a	-15,01 a	56,24 a
Q + T ¹	57,39 a	-17,58 ab	49,71 ab
Q + I ²	57,19 a	-18,32 ab	50,33 ab
C.V. (%)	8,83	-14,85	12,86

^yMédia de dez frutos por tratamento.

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

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

Tabela 5 - Cor de casca de laranjas 'Pêra Rio' tratadas com quitosana e fungicidas avaliados após 26 dias (os frutos permaneceram por 21 dias sob armazenamento a 3° C/90% UR, seguido por transferência para condição ambiente (25° C/80% UR), onde permaneceram por mais 5 dias)

Tratamentos	L ^{y,x}	a ^{y,x}	b ^{y,x}
Dia da coleta	54,36	-20,17	39,87
Testemunha	63,90 a	-14,71 a	55,40 a
Quitosana	64,92 a	-13,80 a	54,42 a
Tiabendazol	62,80 a	-15,41 a	41,42 b
Imazalil	63,47 a	-14,15 a	54,30 a
Q + T ¹	61,57 a	-14,97 a	47,20 ab
Q + I ²	63,91 a	-15,57 a	53,39 a
C.V. (%)	7,87	-18,92	13,25

^yMédia de dez frutos por tratamento.

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

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

Após período de armazenamento a temperatura ambiente (Tabela 6), e refrigerado (Tabela 7) seguido por transferência para condição ambiente (Tabela 8), não constatou-se alterações significativas quanto a sólidos solúveis e pH. Para o atributo acidez titulável, observou-se maior acidez para os frutos tratados com tiabendazol e quitosana aplicada com imazalil, avaliados sete dias após armazenamento em temperatura ambiente, diferenças mínimas que não são perceptíveis. Os frutos que permaneceram por 21 dias em armazenamento refrigerado e foram transferidos para temperatura ambiente, onde permaneceram por mais cinco dias, apresentaram diferença estatística quanto aos valores de vitamina C. O tiabendazol e o imazalil, aplicados isoladamente ou com a quitosana, apresentaram os menores valores para este parâmetro. Todos os tratamentos apresentaram diminuição do *ratio* sete dias em temperatura ambiente com relação a testemunha e o dia da coleta, porém a quitosana não diferiu estatisticamente da testemunha. Aos 21 dias de armazenamento em refrigeração, a quitosana apresentou maior valor do *ratio* e aos 26 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 6 - Análises físico-químicas de laranjas ‘Pêra Rio’ tratadas com quitosana e fungicidas e avaliados 7 dias após o armazenamento a 25° C/80% UR

Tratamentos	Sólidos solúveis (° Brix)	pH	Acidez titulável (g ác. cítrico 100 g ⁻¹)	Vitamina C (mg ác. ascórbico 100 g ⁻¹)	<i>Ratio</i>
Dia da coleta	8,87	3,35	1,09	42,78	8,14
Testemunha	9,16 a	3,39 a	1,06 b	43,75 a	8,63 a
Quitosana	8,53 a	3,38 a	1,07 b	46,02 a	8,00 ab
Tiabendazol	8,84 a	3,27 a	1,29 a	48,31 a	6,83 b
Imazalil	9,03 a	3,26 a	1,14 ab	46,84 a	7,90 ab
Q + T ¹	8,52 a	3,36 a	1,09 b	45,91 a	7,79 ab
Q + I ²	8,74 a	3,28 a	1,30 a	44,22 a	6,74 b
C.V (%)	9,03	3,32	11,52	9,87	12,23

Médias de dez frutos por tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

Tabela 7 - Análises físico-químicas de laranjas 'Pêra Rio' tratadas com quitosana e fungicidas e avaliados 21 dias após o armazenamento a 3° C/90% UR

Tratamentos	Sólidos solúveis (° Brix)	pH	Acidez titulável (g ác. cítrico 100 g ⁻¹)	Vitamina C (mg ác. ascórbico 100 g ⁻¹)	Ratio
Dia da coleta	8,87	3,35	1,09	42,78	8,14
Testemunha	8,83 a	3,41 a	0,98 a	42,75 a	8,98 ab
Quitosana	8,86 a	3,41 a	0,97 a	42,64 a	9,12 a
Tiabendazol	8,66 a	3,27 a	1,18 a	44,82 a	7,36 b
Imazalil	8,16 a	3,42 a	1,03 a	44,55 a	7,94 ab
Q + T ¹	8,62 a	3,29 a	1,17 a	45,30 a	7,39 b
Q + I ²	8,64 a	3,34 a	1,05 a	42,56 a	8,22 ab
C.V (%)	6,51	3,44	15,46	8,86	14,93

Médias de dez frutos por tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

Tabela 8 - Análises físico-químicas de laranjas 'Pêra Rio' tratadas com quitosana e fungicidas. Os frutos permaneceram por 21 dias em armazenamento a 3° C/90% UR e foram transferidos para câmara de 25° C/80% UR, onde permaneceram por mais 5 dias e foram avaliados

Tratamentos	Sólidos solúveis (° Brix)	pH	Acidez titulável (g ác. cítrico 100 g ⁻¹)	Vitamina C (mg ác. ascórbico 100 g ⁻¹)	Ratio
Dia da coleta	8,87	3,35	1,09	42,78	8,14
Testemunha	8,48 a	3,41 a	0,98a	50,03 a	8,68 a
Quitosana	8,30 a	3,36 a	1,04 a	52,90 a	8,00 a
Tiabendazol	8,84 a	3,38 a	1,04 a	42,40 b	8,52 a
Imazalil	8,58 a	3,37 a	1,04 a	46,38 ab	8,26 a
Q + T ¹	8,70 a	3,31 a	1,11 a	42,24 ab	7,82 a
Q + I ²	8,72 a	3,36 a	1,00 a	40,42 b	8,70 a
C.V (%)	6,70	2,89	14,67	11,17	14,97

Médias de dez frutos por tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Quitosana + Tiabendazol; ²Quitosana + Imazalil

2.3.2.4 Quitosana, UV-C e tiabendazol

O primeiro experimento com quitosana, luz UV-C e fungicida tiabendazol foi realizado em setembro de 2005. Os frutos apresentavam 10,4 °Brix e estavam maduros. As Figuras 21 e 22 trazem os resultados relativos ao lote que permaneceu dez dias na câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR, evidenciando que o tratamento com quitosana (tratamento 3) resultou em melhor controle da mancha preta, suprimindo o aparecimento de novas lesões, em comparação com a testemunha. A aplicação do fungicida tiabendazol (tratamento 2) resultou na redução do aparecimento de sintomas com relação à testemunha, mas não apresentou resultado satisfatório. A luz UV-C não diferiu significativamente da testemunha e do fungicida, não controlando satisfatoriamente o aparecimento de novas lesões. As combinações de fungicida com quitosana (tratamento 5), UV-C com quitosana (tratamento 7) e quitosana com o fungicida e UV-C (tratamento 6), mostraram controle semelhante ao tratamento 3, ou seja, apenas com a aplicação de quitosana, indicando que este produto controla o aparecimento de lesões sem a necessidade de aplicação de outros.

O lote que permaneceu por 21 dias na câmara a $3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/90\text{-}95\%$ UR, com transferência para câmara de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR com permanência de cinco dias apresentou menos lesões surgidas devido ao resfriamento dos frutos (Figuras 23 e 24). Os resultados evidenciam que a quitosana resultou em melhor controle no aparecimento de lesões confirmando que este produto apresenta níveis de controle satisfatório, sem a necessidade de aplicação de outros.

O segundo experimento foi realizado com laranjas 'Valência' temporões, colhidas em fevereiro de 2006. A Figura 25 exibe que os melhores resultados obtidos para o controle do aparecimento de novas lesões em temperatura ambiente foram o 6 e 7, fungicida+quitosana+UV-C e quitosana+UV-C, respectivamente, embora não tenham diferido estatisticamente da testemunha, do fungicida e da quitosana (tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente). Como no primeiro experimento, a luz UV-C não apresentou controle do aparecimento de novas lesões.

O lote que permaneceu por 21 dias na câmara a $3^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/90\text{-}95\%$ UR, com transferência para câmara de $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR com permanência de sete dias (Figuras 26 e 27) apresentou menos lesões surgidas devido ao resfriamento dos frutos. No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

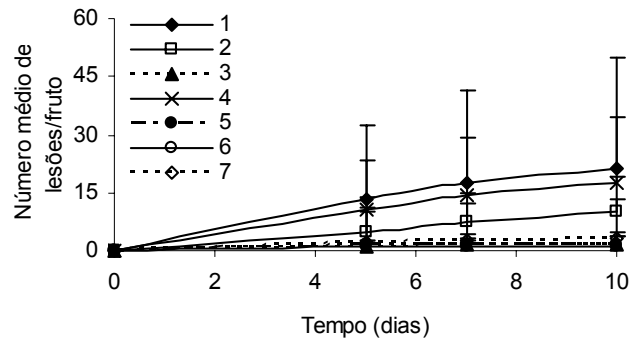


Figura 21 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Valência’ mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR. As avaliações foram feitas no 5º, 7º e 10º dias após o tratamento (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão. Tratamentos: 1- testemunha; 2- tiabendazol; 3- quitosana; 4-UV-C; 5- tiabendazol+quitosana; 6- thiabandazole+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

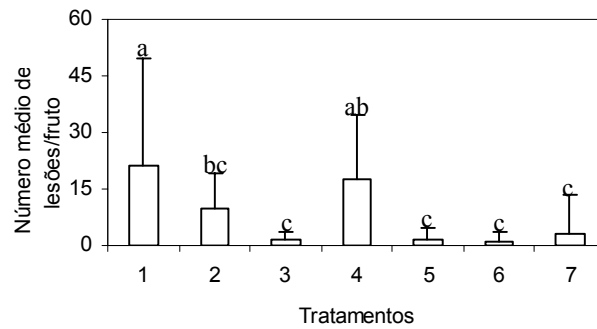


Figura 22 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Valência’ mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR, dez dias após o tratamento, (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=40$). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Tratamentos: 1- testemunha; 2- tiabendazol; 3- quitosana; 4- UV-C; 5- tiabendazol+quitosana; 6- thiabandazole+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

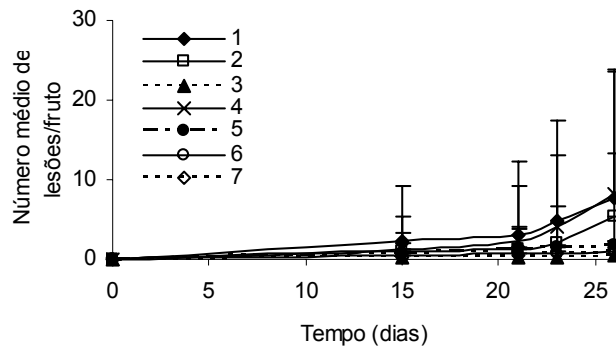


Figura 23 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidas em câmara de 3°C/80% UR por 21 dias, foram avaliados no 15° e 21°, posteriormente transferidos para a câmara de 25°C/80% UR, onde permaneceram por 5 dias e foram avaliados no 2° e 5° dias (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão. Tratamentos: 1- testemunha; 2- fungicida; 3- quitosana; 4-UV-C; 5- fungicida+quitosana; 6- fungicida+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

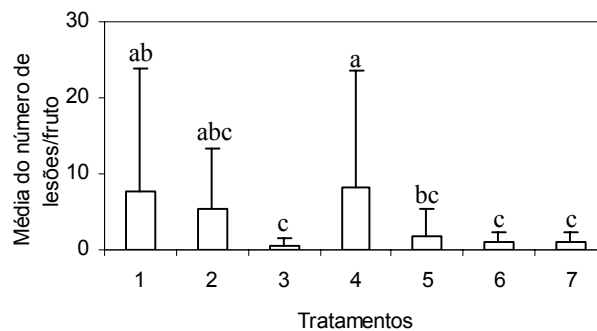


Figura 24 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidos em câmara de 3°C/80% UR por 21 dias e transferidos para a câmara de 25°C/80% UR, onde permaneceram por 5 dias (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Tratamentos: 1- testemunha; 2- fungicida; 3- quitosana; 4- UV-C; 5- fungicida+quitosana; 6- fungicida+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

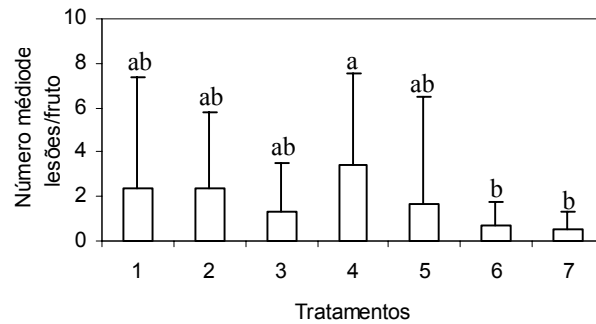


Figura 25 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Valência’ mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR, dez dias após o tratamento, (segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=40$). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% Tratamento: 1- testemunha; 2- tiabendazol; 3- quitosana; 4- UV-C; 5- tiabendazol+quitosana; 6- thiabendazole+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

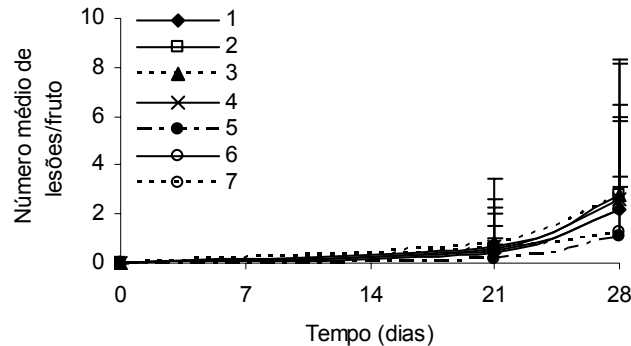


Figura 26 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Valência’ mantidas em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 7 dias e foram avaliados(segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão. Tratamentos: 1- testemunha; 2- fungicida; 3- quitosana; 4-UV-C; 5- fungicida+quitosana; 6- fungicida+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

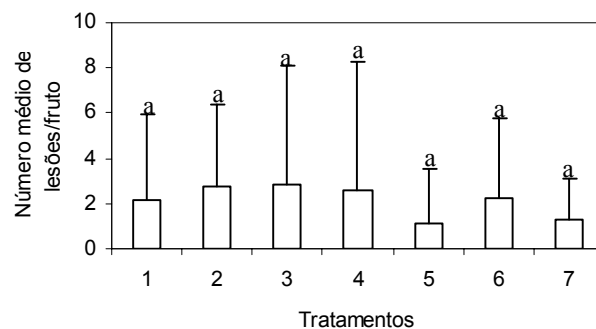


Figura 27 - Média do número de lesões surgidas em laranjas ‘Valência’ mantidos em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias e foram transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 7 dias (segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=40$). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Tratamentos: 1- testemunha; 2- fungicida; 3- quitosana; 4- UV-C; 5- fungicida+quitosana; 6- fungicida+quitosana+UV-C; 7- quitosana+UV-C

2.3.2.5 Quitosana e proteína harpina

Na Figura 28, observa-se que apareceram menos lesões nos submetidos ao tratamento quitosana, quando aplicada isoladamente, ou quando em conjunto com a proteína harpina. Tanto o tratamento com quitosana quanto o indutor Messenger[®] e ambos, aplicados conjuntamente, não apresentaram diferença estatística entre si.

Quando mantidos sob refrigeração (Figuras 29 e 30), não houve diferença estatística entre os tratamentos. É possível observar que a testemunha desenvolveu maior número de lesões em ambas as avaliações efetuadas (aos 21 e 26 dias após o tratamento). Constatou-se que aos 21 dias, o tratamento com quitosana apresentou maior número de lesões em comparação com o tratamento com Messenger e com o tratamento Quitosana+Messenger[®]. Sob refrigeração, o tratamento Quitosana+Messenger[®] apresentou melhor controle da doença. Os frutos utilizados neste ensaio encontravam-se imaturos e com pouco inóculo proveniente de campo, desenvolvendo poucas lesões em pós-colheita.

No segundo ensaio os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha apresentando diminuição no aparecimento de novas lesões em temperatura ambiente (Figura 31). A quitosana aplicada isoladamente apresentou menor média de número de lesões em comparação com o Messenger[®]. Nos frutos armazenados sob refrigeração (Figuras 32 e 33) não foi observada diferença estatística. O número de lesões que surgiram nesta condição foi menor em comparação à temperatura ambiente, evidenciando que a refrigeração exerceu efeito sobre a manifestação dos sintomas da doença.

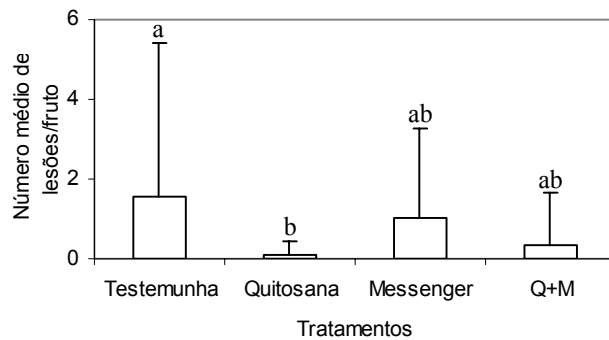


Figura 28 - Média do número de lesões de mancha preta surgidas em laranjas 'Valência' mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR por 12 dias após o tratamento, (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=40$). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Q+M= Quitosana +Messenger

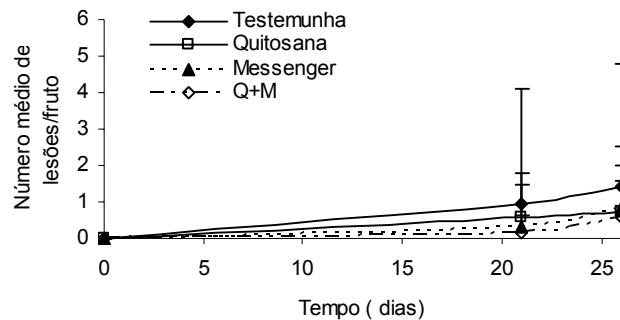


Figura 29 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidos em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 5 dias e foram avaliados (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão. Q+M= Quitosana+Messenger

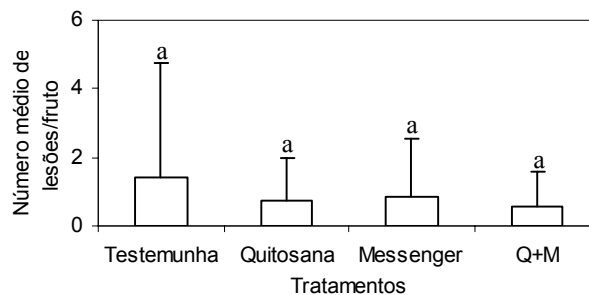


Figura 30 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidos em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias e foram transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 5 dias e foram avaliados 26 dias após o tratamento (primeiro experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=40$). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Q+M= Quitosana+Messenger

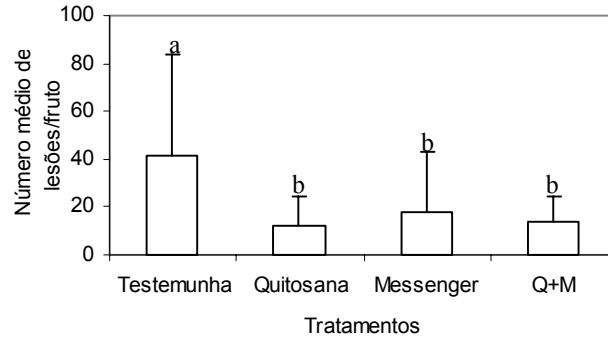


Figura 31 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidas em câmara a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/75\text{-}85\%$ UR, 12 dias após o tratamento (segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Q+M= Quitosana+Messenger

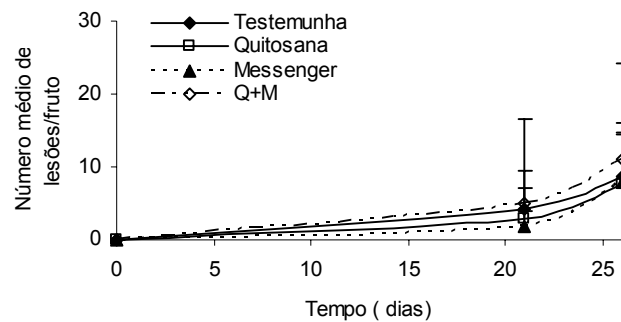


Figura 32 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidas em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 5 dias e foram avaliados (segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão. Q+M= Quitosana + Messenger

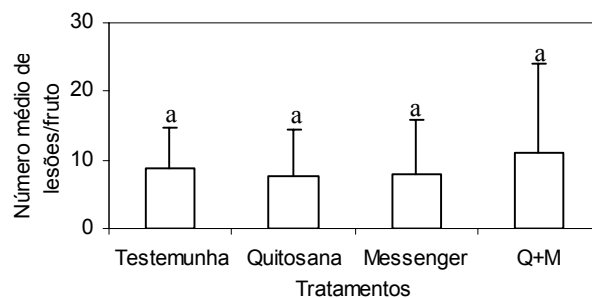


Figura 33 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidos em câmara de $3^{\circ}\text{C}/80\%$ UR por 21 dias, foram avaliados e transferidos para a câmara de $25^{\circ}\text{C}/80\%$ UR, onde permaneceram por 5 dias e foram avaliados (segundo experimento). As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Q+M= Quitosana+Messenger

2.3.2.6 Quitosana e ácido cítrico

Conforme observa-se na Figura 34, o tratamento com quitosana diferenciou-se estatisticamente da testemunha e do tratamento com ácido cítrico.

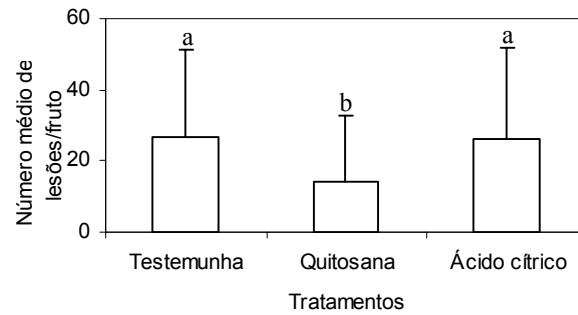


Figura 34 - Média do número de lesões surgidas em laranjas 'Valência' mantidas a 25°C/80% UR por 12 dias após o tratamento,. As barras representam a média \pm desvio padrão (n=40). Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%

2.3.3 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foram utilizadas as laranjas ‘Valência’ do segundo experimento do item 2.3.2.4. A quitosana induziu o aumento das atividades de quitinase, glucanase, peroxidase e polifenoloxidase nas primeiras 24 h após o tratamento (Figura 35). A quitinase e a β -1,3-glucanase atingiram atividade máxima 24 h após o tratamento e, após este período, as enzimas peroxidase e polifenoloxidase apresentaram tendência de aumento. Houve diferença estatística para a enzima peroxidase 24 h após o tratamento. Não houve atividade de fenilalanina amônia-liase (dados não representados).

A concentração de fenóis foi semelhante na testemunha e no tecido tratado com quitosana (Figura 36), evidenciando que não houve estímulo do acúmulo destes compostos nas cascas das laranjas. Observa-se uma tendência de aumento dos compostos fenólicos 72 h após o tratamento.

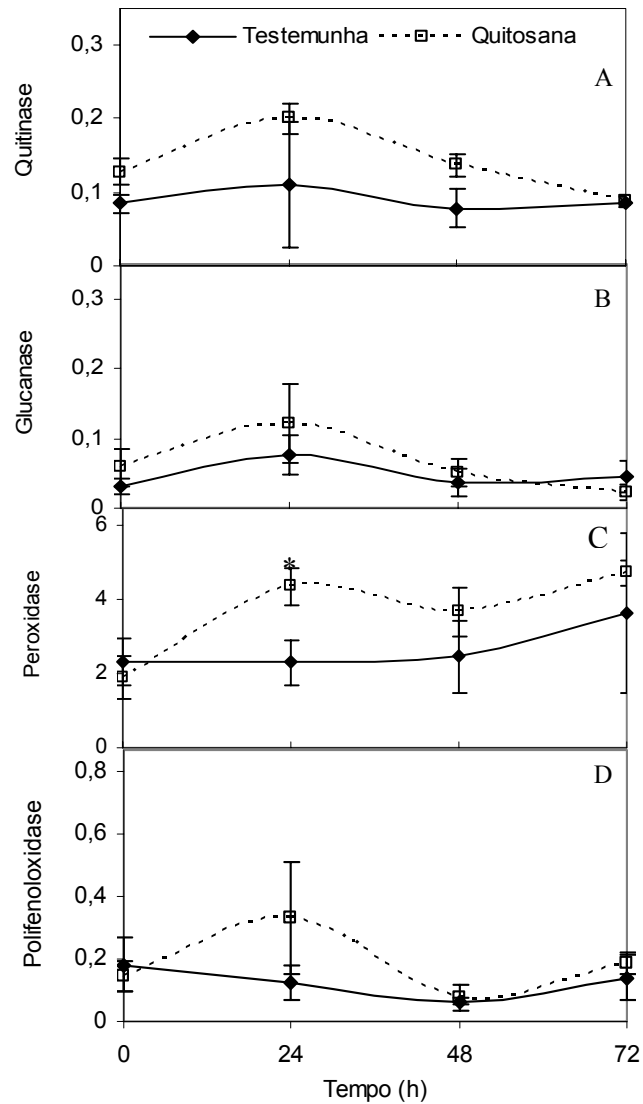


Figura 35 - Atividade de quitinase (A), β -1,3-glucanase (B), peroxidase (C) e polifenoloxidase (D) (UAbs min⁻¹ mg proteína⁻¹) em cascas de laranjas 'Valência', submetidas a tratamento com quitosana 2%. Barras representam média \pm Erro Padrão. *Difere entre si pelo teste de Tukey 5%

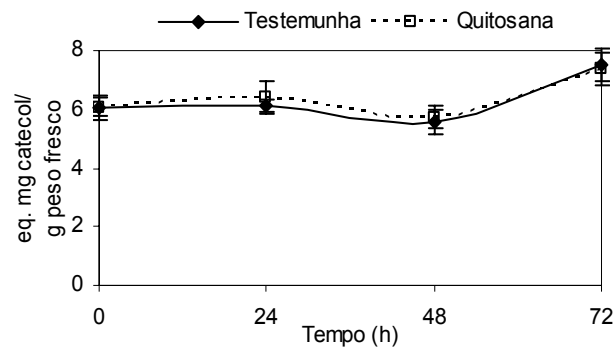


Figura 36 - Concentração de compostos fenólicos em cascas de laranjas 'Valência' submetidas a tratamento com quitosana 2%. Barras representam média \pm Erro Padrão

2.4 Discussão

2.4.1 Efeito *in vitro* da quitosana sobre *G. citricarpa*

A quitosana exibiu efeito *in vitro* sobre *G. citricarpa*, inibindo completamente o crescimento micelial do fungo em todas as concentrações avaliadas. Cia (2005) também observou que a quitosana exerceu influência sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, causador da antracnose em mamão, inibindo completamente o desenvolvimento do fungo, mas de maneira não dependente da dose. Foi, porém, considerado possível ser a inibição devida ao ácido acético, substância na qual a quitosana foi diluída naquele estudo. A quitosana utilizada nos ensaios com *G. citricarpa* foi diluída em ácido cítrico, o qual também pode ter sido responsável pela inibição. No entanto, o ácido cítrico acrescentado em ensaio de germinação de *G. citricarpa* apresentou maior porcentagem de conídios germinados (RINALDO et al., 2006).

No ensaio em que foi avaliado o crescimento micelial de *G. citricarpa* em presença da quitosana, ácido cítrico, tiabendazol e imazalil, constatou-se que os dois primeiros agentes inibiram completamente o desenvolvimento do fungo. Bautista-Baños et al. (2003) também constataram que a quitosana inibiu completamente o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose em mamão, a 2,5 e 3,0%, sendo que para as concentrações de 0,5 e 1,5% o crescimento iniciou-se após dois e quatro dias de incubação, respectivamente, mas cessou após quatro e seis dias. Esses resultados mostram que a quitosana apresenta efeito fungistático.

Embora todas as concentrações de quitosana tenham estimulado a germinação e a formação de apressórios por *G. citricarpa*, observou-se a deformação dos esporos em presença das concentrações avaliadas. Cia (2005) obteve completa inibição da formação de tubo germinativo de *C. gloeosporioides* em todas as concentrações testadas, tendo germinado somente os conídios não expostos ao produto. Plascencia-Jatomea et al. (2003) mostraram que a quitosana produziu agregação de esporos e anomalias morfológicas afetando a germinação, o tubo germinativo e polarização dos esporos de *Aspergillus niger*. Anomalias na germinação dos esporos de *Botrytis cinerea* também foram observadas por Camili (2004).

2.4.2 Efeito *in vitro* da radiação UV-C sobre *G. citricarpa*

A radiação UV-C, por sua vez, não retardou o crescimento micelial de *G. citricarpa*, apresentando efeito hormético (inibição pelas menores doses) nas doses intermediárias e efeito

inibitório mais pronunciado na maior dose aplicada. Nos três primeiros dias após o tratamento, não houve crescimento micelial do fungo nas placas expostas às diversas doses de radiação. Na segunda avaliação, efetuada ao sexto dia após o tratamento, observou-se ralo crescimento micelial, o qual apresentou-se cotonoso nestas placas, diferentemente das placas não irradiadas, nas quais o fungo já se encontrava melanizado (resultados não mostrados). Nas outras avaliações efetuadas, o fungo mostrou-se sem alteração, o que indica que este foi capaz de recuperar o seu crescimento normal. Camili et al. (2004) relata que a radiação foi capaz de retardar o crescimento das colônias de *Botrytis cinerea*, porém, as hifas apresentaram-se menos sensíveis aos efeitos da UV-C, uma vez que, embora o crescimento tenha sido reduzido com o aumento da dose empregada, nenhuma das doses mostrou efeito letal sobre o micélio do patógeno.

Houve redução da germinação e da formação de apressórios por *G. citricarpa* irradiados com luz UV-C, no entanto, os esporos não sofreram deformação. Cia (2005) observou que conídios de *C. gloeosporioides* expostos a doses maiores que $0,4 \text{ kJ m}^{-2}$ não germinaram mesmo após 48 h após os tratamentos e relata que provavelmente o efeito germicida da UV-C foi sobre a germinação dos conídios, por serem mais sensíveis nesta fase à radiação quando comparados ao micélio.

2.4.3 Efeito da quitosana na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta

Foram realizados dois ensaios utilizando diferentes concentrações de quitosana em laranjas ‘Valência’. No primeiro, não foi observado efeito significativo. No segundo ensaio, porém, observou-se efeito significativo no controle das lesões no 6º e 8º dia de avaliação, de maneira dependente da dose. A concentração de 2 % (v/v) foi selecionada para a continuação do trabalho.

Em laranjas ‘Pêra Rio’ a quitosana, tiabendazol e imazalil não controlaram o aparecimento de novas lesões em temperatura ambiente e em refrigeração. Toffano (2005) observou que o fungicida tiabendazol também não controlou o aparecimento de lesões, apresentando melhores resultados os agentes utilizados, ou seja, extratos aquosos de albedo de *Citrus sinensis*, albedo de *Citrus aurantifolia*, *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*. Em refrigeração, no entanto, o tiabendazol demonstrou melhor desempenho. As laranjas tratadas com imazalil, por sua vez, apresentaram elevado número de lesões, não demonstrando controle. Melhor desempenho foi obtido quando os fungicidas foram aplicados juntamente com a

quitosana, que provavelmente coopera para a aderência dos fungicidas à casca da laranja. Em análises físico-químicas das laranjas constatou-se que houve aumento da luminosidade e cromaticidade durante o armazenamento. O desejável nos frutos cítricos é a cor alaranjada. Os pigmentos carotenóides, responsáveis pela coloração da casca ocorrem nos cromoplastos das células do flavedo. Nas frutas cítricas imaturas predomina a cor verde. Durante o amadurecimento ocorre a degradação das clorofilas, começando a predominar os pigmentos amarelos da casca. Estes continuam a aumentar, mesmo depois do completo desaparecimento da clorofila (TAVARES, 2003). As diferenças estatísticas observadas para os valores de a^* no 7º e 21º dia após a coleta indicam que a película formada pela quitosana sobre a superfície do fruto influencia na cromaticidade deste, tanto para o tratamento onde este produto foi utilizado isoladamente quanto em conjunto com os fungicidas. As diferenças observadas quanto aos valores de b^* para os frutos tratados com o tiabendazol pode ser devido ao aspecto esbranquiçado deixado pelo produto na superfície do fruto, que permanece após período de armazenamento. No galpão de embalagem, este resíduo é removido por meio de escovas rotativas.

Não foram constatadas alterações significativas quanto a sólidos solúveis e pH nos sucos de laranja ‘Pêra Rio’, após período de armazenamento refrigerado, seguido ou não por transferência para condição ambiente. Os frutos cítricos possuem sistema de tamponamento que permite que este esteja saturado sem qualquer alteração no pH. (RAMALHO, 2005). São considerados não-climatéricos, sendo o amadurecimento um processo gradual e lento na planta, mantendo níveis respiratórios constantes. Após removido das plantas ocorre um pequeno aumento na taxa respiratória e produção de etileno, evidenciando que os frutos cítricos em pós-colheita estão em senescência. No entanto, o mecanismo de amadurecimento destes frutos não são ainda bem definidos (DOMINGUES et al., 2001).

Houve aumento do teor de ácido ascórbico nos tratamentos testemunha e quitosana, armazenados sob refrigeração por 21 dias e transferidos para temperatura ambiente, onde permaneceram por mais cinco dias. O ácido ascórbico é um dos mais importantes ácidos orgânicos em frutas e vegetais em relação ao valor nutricional e sendo este também inibidor enzimático do bronzeamento (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007). Nos tratamentos onde aplicou-se os fungicidas, os frutos apresentaram menores teores de ácido ascórbico.

O *ratio* é a relação entre o teor de sólidos solúveis (°Brix) e o teor de ácidos tituláveis, sendo este o índice mais utilizado para determinar o estágio de maturação, pois indica o balanço

doce:ácido. O valor aceitável para o consumo de laranjas ‘Pêra Rio’ e ‘Valência’ é de 9,5 (RAMALHO, 2005). Em todos os tratamentos, com exceção da quitosana, os valores de *ratio* diminuíram. Chien et al., (2007) relatam que a quitosana apresentou efeitos benéficos, retardando maturação, perda de água e deterioração de turgor ‘Murcote’, sendo que a firmeza, teor de sólidos solúveis, ácido ascórbico e massa da matéria fresca não foram alterados, afetando beneficamente o fruto cítrico pós-colheita.

A quitosana pode apresentar efeito sobre o material vegetal ou sobre o patógeno. El Ghaouth et al. (1997) evidenciaram que a quitosana pode ter afetado a capacidade de *B. cinerea* de secretar enzimas pectolíticas, denominadas poligalacturonases, que destroem tecidos de pimentão, além de causar mudanças estruturais severas nas células fungicas. El Ghaouth et al. (1994) e El Ghaouth et al. (1997) observaram limitação na proliferação de *B. cinerea* em tecidos de pimentões tratados com quitosana, redução na degradação dos componentes da parede celular do hospedeiro, e danos ao fungo. As hifas invasoras freqüentemente exibiam vários níveis de desorganização celular, desde perda da parede, gradual retração da membrana e até desintegração. No entanto, o mecanismo pelo qual a quitosana afeta o crescimento do patógeno e o potencial de iniciar infecção ainda não é conhecido.

Em nenhum dos experimentos realizados foi observada fitotoxicidade por quitosana à laranjas. Isto também não ocorreu em pimentões (EL GHAOUTH et al., 1994) e em plantas de pepino até a quarta folha verdadeira (BEN-SHALOM et al., 2003).

2.4.4 Efeito da radiação UV-C na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta

Nos ensaios com as diferentes doses de radiação com luz UV-C ocorreu efeito significativo nos 3º e 14º dias de avaliação do primeiro ensaio, no qual ocorreu também o efeito das doses horméticas. Hormese é o estímulo de reações fisiológicas no organismo vivo por baixas doses de um agente estressor, como UV, raio-X ou raio gama (CAMILI et al., 2004; CIA, 2005). Stevens et al. (1998) verificaram efeito hormético de baixa dose de UV-C (7,5 kJ m⁻²), promovendo resistência nos frutos e controlando a infecção quiescente de *Monilinia fructicola* em pêsego. No segundo ensaio houve efeito significativo no 3º e 7º dias de avaliação. Em ambos os experimentos, houve efeito nos três primeiros dias de após o tratamento, indicando que pode ocorrer declínio do efeito induzido no fruto. Por não ser ionizante, a UV-C não penetra no tecido vegetal, sendo assim seu efeito pode parecer secundário, resultando na indução de resistência no

hospedeiro. No entanto, pode ocorrer declínio na resistência induzida pela luz UV-C, sugerindo que o efeito do tratamento com a radiação seja temporário (CAMILI et al, 2005). Ben-Yehoshua et al. (1992) apontam o efeito temporário da radiação UV-C no controle de *P. digitatum* em citros. Visto penetrar pouco no tecido vegetal, o micélio quiescente de *G. citricarpa* pode permanecer viável, podendo causar lesões de mancha preta futuramente.

Nos frutos irradiados que foram submetidas a análises físico-químicas constatou-se que a testemunha ficou levemente mais amarelada, enquanto as altas doses de UV-C acarretaram leve escurecimento da casca dos frutos, em decorrência da aplicação de luz UV-C, efeito também observado em uva por Camili et al. (2005).

2.4.5 Efeito da quitosana, UV-C e tiabendazol na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta

Nos ensaios utilizando quitosana, radiação UV-C e o fungicida tiabendazol observou-se que os frutos tratados com quitosana tinham aspecto brilhante devido à formação da película sobre a casca e se apresentavam mais conservados e com aparência atrativa. Estudos mostram que a quitosana manteve os frutos de morango mais firmes e diminuiu a taxa de respiração deles por modificar a atmosfera ao redor deles (CAMILI et al., 2005). Du et al. (1997) relatam que citros e outros frutos podem ser armazenados por longos períodos cobertos com quitosana, que proporciona um tipo de cobertura ativa, diminuindo a taxa respiratória, inibindo o desenvolvimento fúngico e atraso no amadurecimento através da supressão da evolução de etileno e dióxido de carbono.

O tratamento com o fungicida tiabendazol acarretava na formação de um resíduo branco sobre a casca, sendo este o veículo do agente ativo do produto. Este resíduo, na prática, é retirado dos frutos pós-colheita nos galpões de embalagens com escovas rotativas. Observou-se que, de maneira geral, os frutos tratados com a radiação UV-C exibiram aspecto levemente senescentes, ou seja, com aspecto levemente escurecido e enrugado, diferentemente da testemunha. Apesar dos efeitos positivos promovidos pela UV-C, relatados em diversos trabalhos, alguns efeitos não desejáveis podem ocorrer, como a descoloração da casca em tomates (LIU et al., 1993), escurecimento em morangos (MARQUENIE et al., 2002), aumento da suscetibilidade de pêssegos a mancha parda (STEVENS et al., 1998) e aceleração do amadurecimento e senescência em mangas (GONZALES-AGUILAR et al., 2001).

2.4.6 Efeito da quitosana, proteína harpina e ácido cítrico na proteção de laranja pós-colheita contra a mancha preta

Nos experimentos com quitosana e proteína harpina observou-se que tanto a quitosana quanto o indutor de resistência utilizado apresentam potencial para o controle da mancha preta. Jesus et al. (2006) evidenciaram que a proteína harpina (Messenger[®]) apresenta potencial no controle da mancha preta. Com a aplicação do produto, foi reduzido o desenvolvimento de novas lesões em até 54% e o número de picnídios em até 95%, em comparação com a testemunha.

No primeiro experimento com quitosana e proteína harpina denota-se menor número de lesões de mancha preta em comparação com o segundo experimento realizado, sendo eles executados em épocas diferentes. A produção de ascósporos se concentra entre os meses de novembro a março, ocorrendo, portanto, de primavera a verão, ocorrendo picos entre janeiro e fevereiro. A liberação é relacionada com as chuvas. No entanto, não há correlação entre severidade e molhamento foliar ou número de ascósporos (REIS; TIMMER; GOES, 2006). Observa-se nos experimentos pós-colheita que o período de colheita e grau de maturação dos frutos influenciam no aparecimento de lesões, sendo possível visualizar de maneira mais eficiente os resultados dos tratamentos em frutos colhidos no período entre agosto e novembro. Os frutos colhidos em outros meses apresentam níveis baixos de sintomas devido a ausência de chuvas e temperaturas mais baixas. A manifestação dos sintomas da mancha preta é favorecida por vários fatores, dos quais o mais importante é a exposição dos órgãos infectados a intensa radiação solar e temperaturas elevadas. Plantas velhas e estressadas por várias causas são também muito mais sujeitas à doença do que plantas saudáveis e vigorosas (FEICHTENBERGER et al, 2005).

Em todos os experimentos pós-colheita realizados observou-se menor número de lesões quando os frutos foram armazenados sob refrigeração do que em temperatura ambiente. Isto devido a baixa temperatura de armazenamento, que é o processo mais indicado para prolongar a vida pós-colheita dos produtos vegetais e suprimir ou retardar o desenvolvimento de patógenos (BENATO, 2001).

Foi utilizada nos ensaios quitosana diluída em ácido cítrico devido a disponibilidade do produto nesta condição, em virtude da exigência pelo cultivo orgânico. A quitosana, preparada com ácido cítrico, resultou em melhor controle do aparecimento de novas lesões de mancha preta em comparação com o ácido cítrico, evidenciando que o polímero apresenta efeito sobre a

doença. Joas et al. (2005) relatam que o uso de ácidos orgânicos, como cítrico e tartárico, com quitosana, ao invés de compostos sulfúricos ou ácidos fortes é uma alternativa para prevenir bronzeamento em lichias.

2.4.7 Análises bioquímicas

Foram feitas análises bioquímicas do flavedo das cascas de laranjas ‘Valência’. Ballester et al. (2006) relatam que enzimas como peroxidases e fenilalanina amônia-liase apresentam maior atividade no flavedo, que também apresenta maior resistência ao avanço de *Penicillium digitatum* pela casca da laranja. Clemente (2002) relata que o flavedo exibe maior atividade de peroxidase em comparação com o suco e com o albedo, sendo elas resistentes ao calor e podendo ser regeneradas.

Houve aumento das atividades de quitinase e glucanase nas primeiras 24 h. Porat et al. (2001) relataram que a expressão do gene relacionado a proteína de defesa para glucanase aumentou um dia após os tratamentos realizados em cascas de laranjas ‘Valência’ obtendo resistência a *P. digitatum*. Também relatam que este patógeno poderia interferir nas respostas de defesa da casca do fruto, deixando-o mais propenso para o seu crescimento.

As enzimas estudadas, ou seja, quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase e polifenoloxidase, são participantes do mecanismo de defesa do hospedeiro, prevenindo a infecção por patógenos. El Ghaouth et al. (1994) atribui o efeito inibitório da quitosana à combinação do efeito antifúngico e propriedades elicitoras. Há relatos de que a quitosana tenha controlado doenças pós-colheita em pimentão, mamão, maçã, limão e laranjas, dentro outros (EL GHAOUTH et al., 1994, BAUTISTA-BAÑOS et al. 2003; EL GHAOUTH et al., 2000). Quitosana também elicitou alta atividade de peroxidase e acúmulo de lignina em folhas de trigo, quitosanase em pimentões, bem como aumento da atividade de quitosanase e peroxidase em pepinos (VANDER et al., 1998; EL GHAOUTH et al., 1994; BEN-SHALOM, 2003). Chien et al. (2007) relatam que a quitosana exibiu alta atividade antifúngica, inibindo marcadamente *P. digitatum*, *P. italicum*, *Botrydiploia lecanidion* e *B. cinerea* em frutos de tangor ‘Murcote’ tratados com quitosana e inoculados com os patógenos por fermento. No entanto, El Ghaouth et al. (1994) e Ben-shalom et al. (2003) sugerem que a principal atividade da quitosana é antifúngica, agindo através do efeito fungistático.

Não foi detectada atividade da enzima fenilalanina amônia-liase nas cascas de laranja. Esta enzima cataliza nas plantas o primeiro passo para a síntese de diversos compostos oriundos da via dos fenilpropanóides, como os compostos fenólicos e lignina (Oufedjikh et al., 2000). Por este motivo, provavelmente não houve acúmulo de compostos fenólicos nas cascas. Há uma tendência de aumento dos compostos fenólicos tanto na testemunha quanto no tratamento representado pela quitosana, sugerindo que outra via sintética esteja ativada.

3 CONCLUSÕES

A quitosana e a radiação UV-C apresentaram efeito antifúngico *in vitro* sobre *Guignardia citricarpa*, porém, em condições de pós-colheita, somente a quitosana apresentou potencial na redução do aparecimento de novas lesões de mancha preta nos frutos. Por sua vez, a quitosana estimulou alguns mecanismos de defesa na casca da laranja, como quitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase e polifenoloxidase.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2006.

ANAGNOSTAKIS, S.L. Diversity within populations of fungal pathogens on perennial parts of perennial plants. In: CARROL, G.C.; WICKLOW, D.T. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, v.9. 1992.

BALDASSARI, R.B. **Influência de frutos sintomáticos de uma safra na incidência da *Guignardia citricarpa* na safra subsequente e período de susceptibilidade de frutos de laranja 'Natal' e 'Valência'**. 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2001

BALLESTER, A.R.; LAFUENTE, M.T.; GONZÁLES-CANDELAS, L. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 115-124, 2006.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 1087-1092, 2003.

BENHAMOU, N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, n. 7, p. 693-705, 2004.

BENHAMOU, N.; THERIALT, G. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 33-52, 1992.

BENATO, E.A. Meios físicos de controle de doenças pós-colheita em frutas e indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, p. 258, ago. 2001. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, São Pedro.

BENATO, E.A. A indução de resistência no controle de doenças pós-colheita: frutas e hortaliças. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 1., 2002, São Pedro. **Resumos**, São Pedro: 2002. p. 29-31.

BENATO, E.A.; CIA, P.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 9, p.403-441, 2001.

BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R. AKI, C.; FALLIK, E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 285-290, 2003.

BEM-YEHOSHUA, S.; RODOV, V.; KIM, J.J.; CARMELI, S. Preformed and induced antifungal material of citrus fruit in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.40, p. 1217-1221, 1992.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R. da S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 11-27.

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

CAMILI, E.C. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos aplicados em pós-colheita na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea***. 2004.156p. Dissertação (Mestrado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.

CAMILI, E.C.; CIA, P.; BENATO, E.A. Indução de resistência contra doenças pós-colheita. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 10, p. 195-218.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de irradiação UV-C aplicada em pós-colheita na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 306-313, 2004.

CAPDEVILLE, G. De; BEER, S.V.; WATKINS, C.B.; WILSON, C.L.; TEDECHI, L.O.; AIST, J.R. Pre- and post-harvest Harpin treatments of apple induce resistance to blue mold. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 87, n. 1, p. 34-44, 2003.

CARVALHO, C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M. **Análises químicas de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1990. 121 p. (Manual Técnico).

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 4, p. 81-124.

CHIEN, P.J.; SHEU, F.; LIN, H.R. Coating citrus (Murcott turgor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1160-1164, 2007.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*).** 2005. 197 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

CITRUSFEAT. **Fresh citrus situation.** **FASonline.** Horticultural & Tropical Products Division. 2001 Disponível em: <<http://www.faz.usda.gov>>. Acesso em: 16 set. 2002.

CLEMENTE, E. Peroxidase from oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 215, p. 164-168, 2002.

DOMINGUES, M.C.S.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Indução do amadurecimento de frutos cítricos em pós-colheita com a aplicação de ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, p. 555-558, 2001.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; HOREV, B.; COHEN, L.; GABA, V.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. **Plant Pathology**, London, v. 42, p. 418-424, 1993.

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

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 351-359, 1999.

EDEN BIOSCIENCE. Disponível em: <<http://www.edenbio.com>>. Acesso em: 15 set. 2006.

EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J.L.; WILSON, C. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 19, p. 103-110, 2000.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; CHARLES, W.; BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.12, p. 183-194, 1997.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, p.417-432, 1994.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 82, n. 4, p. 398-402, 1992.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p. 261-296.

- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.239-270.
- FISCHER, I.H.; SPÓSITO, M.B.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Eficiência dos fungicidas thiabendazole + imazalil, aplicados previamente ou em mistura à cera, no controle do bolor verde em citros. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.16, p.22, 2004. (Suplemento).
- FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Laranja. In: _____. Agriannual 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 257-300.
- FUNDECITRUS. **Mancha preta dos citros**. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 20 jul. 2006.
- GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Prague, v. 25, p. 251-255, 2002.
- GÓES, A. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. Laranja, Cordeirópolis, v.9, p. 293-304, 1998.
- GÓES, A. Mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26 p. 245-246, ago. 2001. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, São Pedro.
- GÓES, A.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 9., 2000, Orlando. Orlando: 2000. p. 145.
- GONZALES-AGUILAR, G.A.; WANG, C.Y.; BUTA, J.G.; KRIZEK, D.T. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' mangoes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, p. 767-773, 2001.
- GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed). Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC Lewis, 1997. p. 177-199.
- HERBERT, J.A. **Citrus black spot**. Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Nelspruit: 1989. 30p.

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

HOTO, F.V.; PASCHOLATI, S.F. Oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) em folhas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo*) exibindo prateamento: germinação de conídios, formação de apressórios e aspectos bioquímicos da fitotoxemia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 84-88, 2000.

JESUS, C.O.; LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de isolados de *Bacillus thuringiensis* e de proteína harpina no controle de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de laranja. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v.32, p. 81, 2006.Suplemento. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Botucatu.

JOAS, J.; CARO, Y.; DUCAMP, M. N.; REYNES, M. Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv. Kwaï Mi) by treatment with chitosan and organic acids I. effect of pH and pericarp dehydration. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 38, p. 128-136, 2005.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus disease**. St. Paul: APS Press, 1989. p. 10-12.

LIU, J.; STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y.; WILSON, C.L.; ADEYEYE, O; KABWE, M.K.; PUSEY, P.L.; CHALUTZ, E.; SULTANA, T.; DROBY, S. Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 10, p.868-872, 1993.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MARQUENIE, D.; MICHAELS, C.W.; GEERAERD, A.H.; SCHENK, A.; SOONTJENS, C.; VAN IMPE, J.F.; NICOLAI, B.M. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, p. 187-196, 2002.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 177-184, 2007.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, Sant Paul, v. 57, p. 743-746, 1967.

OUFEDJIKH, H.; MAHROUZ, M.; AMIOT, M.J.; LACROIX, M. Effect of gamma-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to

- peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 559-565, 2000.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap 19, p. 343-364.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 22, p. 417-453.
- PERES, A.P.; SILVA-MANN, R. VIEIRA, M.D.G.; MACHADO, J.D.C. Variabilidade morfo-cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.5, p.1053-1062, 2003.
- PLASCENCIA-JATOMEA, M.; VINIEGRA, G.; OLAYO, R.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; SHIRAI, K. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 3, n. 10, p. 582-586, 2003.
- PORAT, R.; LERS, A.; DORI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; WILSON, C.L.; DROBY, S. Induction of chitinase and β -1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 27, n. 3, p. 233-238, 1999.
- PORAT, R.; VINOKUR, V.; HOLLAND, D.; McCOLLUM, G.; DROBY, S. Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 158, p. 1585-1590, 2001.
- RAMALHO, A.S.T.M. **Sistema funcional de controle de qualidade a ser utilizado como padrão na cadeia de comercialização de laranja Pêra *Citrus sinensis* L. Osbeck**. 2005. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- REIS, R.F; GÓES, A.; TIMMER, L.W. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 29-34, 2006.
- ROMANAZZI, G.; GLABER, M.; SMILANICK, J.L. Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 445-450, 2006.
- RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; FANG, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. **Acta Horticulture**, Leuven, v. 381, p. 517-525, 1994.
- SCHUTTE, G.C.; BEENTON, K.V.; KOTZÉ, J.M. Rind stippling on valência oranges by cooper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 81, p. 851-854, 1997.

- SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.; CAVALCANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, cap. 3, p. 51-80.
- SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; AQUINO, R. Elaboração e validação de escala diagramática para a avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 1, p. 81-85, jan./fev. 2004.
- 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.
- STEVENS, C.; KHAN, V.A.; LU, J.Y. WILSON, C.L.; PUSEY, P.L.; KABWE, M.K.; IGWEGBE, E.C.K.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. The germicidal and hormetic effects of UV-C light on reducing Brown rot disease and yeast microflora of peaches. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, n. 1, p. 75-84, 1998.
- TAVARES, S. **Maturação e conservação do tangor ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* Osbeck) e da lima ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka) sob efeito de biorreguladores**. 2003. 115p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- TOFFANO, L. **Doenças pós-colheita em citrus: potencial de *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei*, ácido jasmônico, albedo (*Citrus sinensis* var. Valência) e flavedo (*Citrus aurantifolia* var. Tahiti) no controle e na indução de resistência**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.
- VANDER, P. KJELL, M.V.; DOMARD, A. EL GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and oligosaccharides to elicit resistance in wheat leaves. **Plant Physiology**, Dordrecht, v. 118, 1353-1359, 1998.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.
- WALKER-SIMMONS, M.; HADWIGER, L.A.; RYAN C.A. Chitosan and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the fungal phytoalexin pisatin in pea pods and

antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, New York, v. 110, p. 194-199, 1983.

WILSON, C.L.; EL GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 837-843, 1994.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colorimetric assay for *endo*-acting cellulose, xylanase chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, p. 511-519, 1992.

ZHANG, T.; LIU, Y.; YANG, T.; ZHANG, L.; XU, S.; XUE, L.; AN, L. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 44, p. 274-283, 2006.

ANEXO

Equações:

Figura 7 - Germinação) $y = 8,27x^3 - 43,48x^2 + 65,23x + 66,31$; Apressório) $y = 9,26x^3 - 48,66x^2 + 65,17x + 62,35$

Figura 11 - Germinação) $y = -0,038x^3 + 1,05x^2 - 7,96x + 15,40$; Apressório) $y = -0,011x^3 + 0,33x^2 - 2,67x + 5,05$

Figura 14 - 3º dia) $y = -0,16x^3 + 0,84x^2 - 0,99x + 1,58$; 7º dia) $y = -0,47x^3 + 2,43x^2 - 2,91x + 2,75$; 10º dia) $y = -0,61x^3 + 3,90x^2 - 5,97x + 6,80$

Figura 15 - 2º dia) $y = -0,20x^3 + 0,72x^2 - 0,47x + 0,54$; 6º dia) $y = 1,57x^2 - 5,15x + 7,72$; 8º dia) $y = 2,49x^2 - 8,38x + 12,96$

Figura 16 - 3º dia) $y = 0,067x + 1,11$; 7º dia) $y = -0,0015x^3 + 0,074x^2 - 0,81x + 8,67$; 10º dia) $y = -0,0024x^3 + 0,11x^2 - 1,42x + 14,17$; 14º dia) $y = 0,034x^2 - 1,26x + 24,27$

Figura 17 - 3º dia) $y = 0,015x + 0,29$; 7º dia) $y = 0,042x + 1,15$; 10º dia) $y = -0,000052x^3 - 0,0035x^2 + 0,097x + 2,04$; 14º dia) $y = 0,000072x^3 - 0,0034x^2 + 0,068x + 3,38$