

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTENIA

**TRATAMENTO COM CALOR NO CONTROLE DE  
*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.) EM  
MAÇÃS CV. FUJI**

Andréia Hansen Oster  
Engenheira Agrônoma/UDESC

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em  
Fitotecnia  
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Setembro de 2004



**DEDICO**

**Aos meus amados filhos  
*Fernanda e Martin* e ao meu  
companheiro *Jaques*.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar sempre o meu caminho.

A minha amada mãe Ingrid pelo amor, compreensão e apoio sempre.

A meu irmão Alexandre pelo carinho e apoio.

A minha família de Porto Alegre, tio Willibaldo, tia Iolanda e meus primos Júlio, Janice, Rui e Luís Felipe pelo carinho, auxílio e apoio em tantos momentos de minha vida.

Ao professor Dr. Renar João Bender pela amizade, orientação e incentivo constante.

À Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza, do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da EMBRAPA, pela orientação, amizade e auxílio em várias etapas do trabalho.

Ao professor Dr. Marcelo Gravina de Moraes, do Departamento de Fitossanidade – UFRGS, pela orientação e valiosas sugestões nos trabalhos de fitopatologia molecular.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Molecular – UFRGS pelo convívio e constante auxílio, em especial ao Marcus e Caren pela contribuição na realização do trabalho.

Aos funcionários da Estação Experimental da EMBRAPA – Vacaria-RS pelo auxílio e amizade.

À Universidade do Planalto Catarinense – UNIPLAC pelo incentivo durante o doutorado.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos colegas do Departamento de Horticultura pela amizade e convívio. Em especial as minhas queridas amigas Adriana Corrent e Aike Kretzschmar pelo carinho, auxílio, incentivo e apoio num momento especial da minha vida.

A todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste Trabalho.

## TRATAMENTO COM CALOR NO CONTROLE DE *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not) EM MAÇÃS CV. FUJI<sup>1</sup>

Autor: Andréia Hansen Oster

Orientador: Renar João Bender

Co-orientador: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

### RESUMO

A necessidade de se prolongar o período pós-colheita fez com que a utilização de tratamentos em pós-colheita com o uso de defensivos agrícolas aumentasse nas últimas décadas. No entanto, a preocupação de consumidores quanto a resíduos as deficiências de controle observadas incentivaram a procura por tratamentos alternativos, entre os quais os tratamentos com calor vem sendo testados em frutos de várias espécies. No presente trabalho estudou-se o efeito do tratamento com calor no crescimento do micélio e germinação dos conídios de *Botryosphaeria dothidea* e, avaliou-se a viabilidade da termoterapia com calor, isolada ou em combinação com carbonato de sódio no controle da podridão branca e na manutenção da qualidade das maçãs 'Fuji' em diferentes estádios de maturação, mantidas ou não sob armazenamento refrigerado. Foi objetivo também verificar a expressão de genes que são regulados durante a interação maçã-*Botryosphaeria dothidea*, após tratamento com calor. Os experimentos foram conduzidos testando-se combinações de diferentes temperaturas e períodos de exposição ao calor sobre o patógeno *B. dothidea* e sobre frutos inoculados e não inoculados artificialmente com o patógeno. Os resultados obtidos sobre o patógeno mostraram que, independente da concentração de caldo batata-dextrose (BD) utilizada na suspensão, 45% dos conídios de *B. dothidea* germinaram nos frutos após 24h e 91% após 48h de incubação a 26°C. Constatou-se um aumento significativo da germinação dos conídios quando acrescentado 2,4% de caldo BD a suspensão. Sobre o efeito da temperatura no patógeno, as temperaturas inferiores a 62°C, em qualquer período de exposição não foram capazes de inibir o micélio do patógeno. Os conídios submetidos à temperatura de 58°C somente foram inativados quando o tratamento foi estabelecido por 60s. A termoterapia com calor associada ou não ao carbonato de sódio reduziu a incidência e severidade da doença podridão branca. A severidade da doença foi influenciada pelo estágio de maturação dos frutos verificando pelo aumento no número de lesões/fruto quanto mais avançada a maturação das maçãs. Os resultados obtidos no RT-PCR evidenciaram que os protocolos utilizados não produziram RNA de alta qualidade e desta forma inviabilizaram a análise da expressão diferencial dos genes na interação maçã-*B.dothidea*.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (84 p.) Setembro, 2004.

## HEAT TREATMENTS TO CONTROL *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not) ON APPLES CV. FUJI <sup>2</sup>

Author: Andréia Hansen Oster

Adviser: Renar João Bender

Co-adviser: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

### ABSTRACT

The need to prolong shelf-life after harvest having reduced losses of fruits due to rot incidence resulted in an increased use of agrochemicals over past few years. Nevertheless, consumer concerns with regards to pesticide residues and the fact that these widely-applied chemicals after harvest have shown some lack of control effectiveness encouraged the search for alternative methods to control postharvest pathogens. Heat treatments to control postharvest pathogens have been tested in many fruit species. In the present work heat treatments were applied to determine the effect of heat on mycelium growth and conidia germination of *Botryosphaeria dothidea* as well as to evaluate the efficacy of thermotherapy with heat alone or in combination with sodium carbonate on the control of white rot and fruit quality maintenance of Fuji apples of different ripening stages after cold storage. It was also intended to determine gene upregulation in the system apple-*B. dothidea* after treatments with heat. The experiments were conducted testing combinations of different temperatures and heat-exposure times on the pathogen *B. dothidea* and on inoculated and not inoculated apples. 45% of the conidia of *B. dothidea* germinated after 24 hours and 91% germinated after 48 hours of incubation at 26°C independently of the potato-dextrose (PD) concentrations utilized in the suspension, however, a significant increase in conidia germination is observed when 2,4% of PD is added to the suspension. Temperatures below 62°C at any exposure time did not inhibit mycelium growth. Conidia were only inactivated at 58°C after one minute exposure time. Thermotherapy with heat associated or not to sodium carbonate reduced incidence and severity of the disease caused by *B. dothidea*. The severity was also influenced by the ripening stage of the apples. The riper the apples the higher the number of wounds of the fruit. The results of RT-PCR indicate that the used protocols did result in high quality RNA which impeded differential expression analysis of genes in the system apples-*B. dothidea*.

---

<sup>2</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (84 p.) September, 2004.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>Germinação de conídios e crescimento micelial de <i>Botryosphaeria dothidea</i> são influenciados por tratamento com calor</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
2.2.1 Virulência de isolados de <i>Botryosphaeria dothidea</i> .....	8
2.2.2 Germinação dos conídios de <i>B. dothidea in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	9
2.2.3 Germinação dos conídios e crescimento do micélio de <i>B. dothidea in vitro</i> sob diferentes temperaturas .....	12
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 Virulência dos isolados de <i>B. dothidea</i> .....	14
2.3.2 Germinação dos conídios de <i>Botryosphaeria dothidea in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	15
2.3.3 2.3.3 Germinação dos conídios e crescimento do micélio de <i>B. dothidea in vitro</i> sob diferentes temperaturas .....	18
<b>3. CAPÍTULO III</b> .....	<b>21</b>
<b>Aspersão de água quente no controle pós-colheita da podridão branca causada pelo patógeno <i>Botryosphaeria dothidea</i> em maçã ‘Fuji’</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.2.1 Patógeno.....	30
3.2.2 Frutos.....	31
3.2.3 Inoculação dos frutos .....	32
3.2.4 Aplicação do calor .....	32
3.2.5 Tratamentos .....	34
3.2.6 Avaliações .....	37

<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Efeito dos tratamentos sobre a doença podridão branca.....	38
3.3.2	Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade das maçãs 'Fuji' .....	50
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>57</b>
	<b>Isolamento de RNA para estudo da expressão diferencial de genes durante a interação entre frutos de maçã (<i>Malus domestica</i> Borkh.) e <i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. &amp; De Not. ....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
4.2.1	Patógeno.....	62
4.2.2	Inoculação dos frutos.....	63
4.2.3	Aplicação do calor.....	64
4.2.4	Tratamentos.....	64
4.2.5	Isolamento de RNA total .....	65
4.2.6	Quantidade e qualidade do RNA total.....	67
4.2.7	Análise da expressão dos genes através de Diferencial Display -RT-PCR.....	68
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Isolamento do RNA total .....	69
4.3.2	Análise da expressão dos genes através de Diferencial Display/RT-PCR.....	73
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>VITA.....</b>	<b>84</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1.	Número de lesões de podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas ( $10^5$ conídios/mL) com diferentes isolados de <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após incubação a 26°C durante 13 dias, Vacaria, RS, 2003.....	15
TABELA 2.	Germinação de conídios de <i>B. dothidea</i> , suspensos em diferentes concentrações de caldo batata-dextrose (BD), após incubação a 26°C por 12, 24 e 48 horas, em maçãs 'Fuji', Vacaria, RS, 2003.....	17
TABELA 3.	Diâmetro das colônias de <i>Botryosphaeria dothidea in vitro</i> (Isolado 10) submetidas a diferentes temperaturas e períodos de exposição, Porto Alegre, RS, 2003.....	18
TABELA 4.	Diâmetro das colônias de isolados de <i>Botryosphaeria dothidea</i> desenvolvidas a partir de discos de micélio submetidos a diferentes condições de temperatura durante 30 segundos, Vacaria, RS, 2003.....	19
TABELA 5.	Germinação dos conídios de <i>Botryosphaeria dothidea in vitro</i> , em meio BDA, sob diferentes temperaturas e períodos de exposição, Vacaria, RS, 2003.....	19
TABELA 6.	Valores iniciais de firmeza da polpa (N), sólidos solúveis totais (%) e acidez titulável (meq ácido málico/100 mL suco) nos diferentes estádios de maturação de maçãs 'Fuji', Vacaria, RS, 2003.....	32
TABELA 7.	Relação dos níveis do fator temperatura e fator períodos de exposição utilizados nos diferentes experimentos.....	35
TABELA 8.	Porcentagem de podridão branca em frutos de maçãs 'Fuji' inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> em diferentes períodos de exposição ao tratamento com calor, Vacaria, RS, 2001 (Experimento 1). ....	39
TABELA 9.	Diâmetro (mm) das lesões em maçãs 'Fuji' inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2001 (Experimento 1).....	39

TABELA 10. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> após tratamento com calor, Vacaria-RS, 2003 (Experimento 2). .....	40
TABELA 11. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2002 (Experimento 3). .....	41
TABELA 12. Percentagem de frutos infectados e número de lesões de podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas com <i>Botryosphaeria dothidea</i> após tratamento com calor durante 30 segundos, Vacaria-RS, 2003 (Experimento 4).....	41
TABELA 13. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , tratadas com água quente e carbonato de sódio, Vacaria-RS, 2003. ....	43
TABELA 14. Incidência de podridão branca em maçãs 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , Vacaria, RS, 2003.....	48
TABELA 15. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' após a incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003. ....	48
TABELA 16. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após 3 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003. ....	49
TABELA 17. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após 5 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003.....	50
TABELA 18. Características físico-químicas iniciais das maçãs 'Fuji' nos diferentes experimentos, Vacaria-RS, 2000/2003. ....	50
TABELA 19. Características físico-químicas em maçãs 'Fuji' inoculadas com <i>B. dothidea</i> após tratamento com calor e incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003. (Experimento 3).....	51
TABELA 20. Características físico-químicas em maçãs 'Fuji' inoculadas com <i>B. dothidea</i> após tratamento com calor e incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003. (Experimento 4).....	51

TABELA 21. Características físico-químicas de maçã 'Fuji' inoculadas com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após tratamento com calor associado ao carbonato de sódio, Vacaria, RS, 2003. ....	52
TABELA 22. Características físico-químicas de maçã 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2003.....	53
TABELA 23. Características físico-químicas de maçãs 'Fuji' nos diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2003.....	53
TABELA 24. Características físico-químicas de maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após 3 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003. ....	54
TABELA 25. Características físico-químicas de maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , após 5 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003. ....	55
TABELA 26. Características de absorbância e produção de RNA, de frutos de maçã, obtidos através de dois métodos de isolamento, Porto Alegre, RS, 2003/2004. ....	70

## RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1.	Detalhe da lesão interna (a) e externa (b) causada por <i>Botryosphaeria dothidea</i> em maçãs 'Fuji'.....	6
FIGURA 2.	Germinação de conídios de <i>B. dothidea</i> <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de batata-dextrose (BD), após 12 h de incubação a 26°C, Vacaria, RS, 2003. ....	16
FIGURA 3.	Detalhe do equipamento para a aspersão da água, acoplado a máquina classificadora de frutos, Vacaria, RS, 2000. ....	33
FIGURA 4.	Detalhe da barra com os bicos de aspersão de água do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015), Vacaria, RS, 2000. ....	33
FIGURA 5.	Detalhe da aplicação dos tratamentos nos frutos através da aspersão da água quente, Vacaria, RS, 2000. ....	34
FIGURA 6.	Severidade da doença podridão branca em maçãs 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, inoculadas artificialmente com <i>Botryosphaeria dothidea</i> , Vacaria, RS, 2003. ....	46
FIGURA 7.	Severidade da doença podridão branca em diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor durante 30 segundos, Vacaria, RS, 2003. ....	47
FIGURA 8.	Eletoforese em gel de agarose do RNA total de epiderme + polpa de maçã 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. (A) Amostras de RNA extraídas segundo o protocolo LFM-UFRGS (B) Amostras de RNA extraídas segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992). Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL).....	72

## 1. CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

O cultivo da maçã (*Malus domestica* Borkh.) está concentrado na Região Sul do Brasil, onde os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul representam 96% da produção total. De acordo com Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM) a produção total de maçã no Brasil, na safra 2003/2004, foi de aproximadamente 1.100.000 toneladas em uma área de cerca de 31 mil ha. As principais variedades cultivadas nos estados líderes são Gala e Fuji, que representam respectivamente 40% e 38% da produção (Associação Brasileira de Produtores de Maçã - ABPM, 2004).

A fase de pós-colheita é extremamente importante para maçã, pois sendo um produto perecível, é nesta fase que ocorrem perdas de qualidade dos frutos, principalmente devido à desidratação, amadurecimento e ocorrência de podridões e distúrbios fisiológicos.

A necessidade de se prolongar o período de armazenamento, sem perdas de frutos em decorrência de problemas fitossanitários, fez com que a utilização de tratamentos em pós-colheita com o uso de defensivos agrícolas aumentasse nos últimos anos. Por outro lado, as pressões dos consumidores de países mais desenvolvidos quanto aos resíduos destes produtos químicos impuseram restrições regulamentares que reacenderam o interesse em métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita, que haviam sido

colocados em plano secundário com a expansão da indústria química (Couey, 1989). No Brasil, em menor escala, estas pressões também estão sendo exercidas sobre os produtores e, principalmente, em produtos que possam ser exportados para o consumo *in natura*, como, por exemplo, a maçã.

Nas doenças pós-colheita da cultura da maçã, as de mais difícil controle são a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.), a podridão amarga (*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld.& Schrenk), e a mancha foliar de *Glomerella* (*Glomerella* spp). Estas doenças tornam-se mais evidentes à medida que se aproxima a colheita, quando a utilização de fungicidas é mais restrita.

Em maçãs da cultivar Fuji, tem sido observado, nos últimos anos, incrementos nas perdas pós-colheita devido à incidência de patógenos. Estes incrementos são, possivelmente, resultado da maior pressão do inóculo e do surgimento de raças resistentes aos fungicidas tradicionalmente utilizados para o controle.

Tendo em vista que há um número restrito de defensivos agrícolas passíveis de uso em pós-colheita, que estes tratamentos químicos tradicionalmente empregados não apresentam mais a eficiência de controle que os consagrou, e considerando a possibilidade de se perder mercados potenciais devido à presença de resíduos, ressurge, também no Brasil, uma demanda para métodos alternativos de controle de infecções.

Entre os métodos alternativos de controle de doenças pós-colheita de frutos está o tratamento com calor. Esta técnica, que já vem sendo testada em diversos frutos, poderia atuar no controle de podridões pós-colheita através do

efeito letal do aumento da temperatura sobre o patógeno, ou ainda, através da indução de mecanismos de defesa no fruto.

Diversos fatores, relacionados com o patógeno, com o fruto ou na interação entre ambos, poderiam influenciar a eficácia do tratamento com calor no controle das doenças. As informações são escassas sobre o efeito do tratamento com calor no controle de diversas doenças que ocorrem em maçãs na pós-colheita, bem como, a influência deste tratamento na manutenção da qualidade do fruto.

Neste sentido, os trabalhos foram desenvolvidos para verificar o efeito do tratamento com calor na germinação de conídios e crescimento do micélio de *Botriosphaeria dothidea in vitro* (Capítulo 2).

O Capítulo 3 aborda os experimentos realizados para verificar o efeito do tratamento com calor associado ou não ao carbonato de sódio no controle pós-colheita da podridão branca em maçãs 'Fuji'; avaliar a viabilidade do tratamento com calor no controle da podridão branca em frutos de diferentes estádios de maturação e em maçãs armazenadas sob refrigeração, bem como, a influência destes tratamentos nos parâmetros físico-químicos de qualidade de maçãs 'Fuji'.

Por último, o experimento conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular, da UFRGS, teve como objetivo verificar a expressão de genes que são regulados durante a interação maçã-*B. dothidea*, após tratamento com calor (Capítulo 4).

## 2. CAPÍTULO II

### **Germinação de conídios e crescimento micelial de *Botryosphaeria dothidea* são influenciados por tratamento com calor**

#### 2.1 INTRODUÇÃO

A doença podridão branca, causada pelo fungo *B. dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., forma imperfeita *Dothiorella* sp. ou *Fusicoccum aesculi* Corda, é uma das doenças mais importantes que ocorre em maçã (*Malus domestica* Borkh) em diversos países, inclusive no Brasil (Sutton, 1990).

O fungo ascomiceto *B. dothidea* é encontrado em regiões tropicais e temperadas mais quentes (Kim et al., 2001), ocorrendo em uma ampla variedade de espécies, incluindo castanha, pêsego e mirtilo (Travis et al., 2003).

Os ascosporos de *B. dothidea*, produzidos em pseudotécios, são ovóides, hialinos e unicelulares. Já, os conídios, produzidos em picnídios, são hialinos e não septados. Ambas estruturas de frutificação sobrevivem em cancos de ramos e troncos, sendo liberados na primavera e dispersados através do vento e da água da chuva, infectando os frutos em desenvolvimento (Sutton, 1981, 1990).

As lesões no fruto normalmente tornam-se visíveis entre seis e oito semanas antes da colheita. No entanto, existem evidências de que a infecção pode ocorrer no início do ciclo vegetativo, permanecendo latente por um longo

período, sem manifestar sintomas até o início da maturação (Sutton & Boyne, 1983; Boneti & Katsurayama, 1999).

Na superfície do fruto os ascosporos e/ou conídios germinam e formam tubos germinativos. Estes se desenvolvem através de aberturas naturais, tais como lenticelas ou rachaduras, ou ainda, através de ferimentos presentes na epiderme do fruto. A penetração dos tubos germinativos pode ser direta, com ou sem a formação de apressórios, através da degradação enzimática das camadas de cutícula (Kim et al., 1999).

As lesões nos frutos inicialmente são pequenas, circulares, com pontuações escuras e circundadas por um halo vermelho. À medida que as lesões evoluem vão se formando anéis concêntricos de coloração marrom-clara alternada com marrom-escura (Figura 1).

Segundo Sutton & Boyne (1983), os isolados de *B. dothidea* variam em morfologia e virulência. Nos experimentos realizados por estes autores, foi verificado que o grau de variação virulência de *B. dothidea* foi semelhante entre os diferentes ambientes de coleta dos isolados, além de verificarem que isolados obtidos de cancrios foram tão patogênicos quanto os isolados obtidos dos frutos de maçãs. Fulkerson (1960) descreve que isolados crescendo em meio batata-dextrose-ágar (BDA) apresentam variações na pigmentação e morfologia do micélio, além de apresentarem variações na capacidade de produzir picnídios.

Em estudos feitos em meio de cultura sólido a temperatura ótima para o crescimento do micélio ocorreu a aproximadamente 30°C (Kohn & Hendrix, 1982). Já, quando Sutton & Arauz (1991) estudaram a germinação dos conídios em água, a temperatura ótima variou de 25-30°C. Estes mesmos

autores verificaram que a temperatura ótima para a germinação dos ascosporos foi menor do que para a germinação dos conídios, e, ainda, o crescimento do tubo germinativo requer temperaturas maiores que a aquelas necessárias para a germinação. De qualquer forma, segundo aqueles autores, sob condições de temperaturas ideais, a germinação de conídios e ascosporos ocorre após 4 horas. A germinação do fungo pode ser dependente em graus variáveis da presença de nutrientes na água (Bailey et al., 1995). Os trabalhos com *B. dothidea* porém, não tem avaliado este fator.

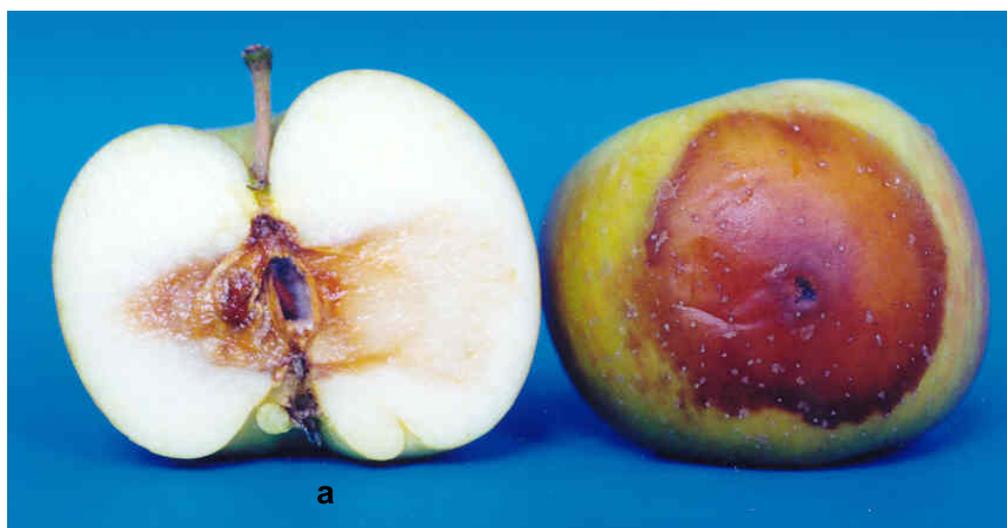


FIGURA 1. Detalhe da lesão interna (a) e externa (b) causada por *Botryosphaeria dothidea* em maçãs 'Fuji'.

Diversos patógenos têm mostrado inibição do crescimento micelial e da germinação dos conídios quando submetidos a temperaturas altas (40-70°C) (Lurie, 1998). Contudo não há relatos de sensibilidade de *B. dothidea* a estas condições.

A eficiência do tratamento com calor sobre o patógeno é normalmente medida pela redução na viabilidade do organismo, tanto na germinação do esporo como no crescimento do micélio (Lurie, 1998). Por outro lado, a

resposta do patógeno ao calor pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, atividade metabólica do patógeno, concentração e idade do inóculo e umidade dos esporos (Barkai-Golan & Phillips, 1991). A umidade, poderia afetar a transferência do calor e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento (Lurie, 1998). Ainda neste sentido, Lurie (1998) afirma que os esporos dos fungos germinados são mais sensíveis ao calor do que os esporos não germinados.

As diferenças genéticas dos fungos podem ser expressas pela considerável variação na sensibilidade as altas temperaturas (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Segundo Karabulut et al. (2002), o crescimento micelial de *Monilinia fructicola* (G. Wint.) Honey foi completamente inibido pela exposição a 50°C durante 10 segundos. Por outro lado, o crescimento de *Penicillium expansum* Link. só foi inibido quando os esporos foram expostos a 60°C durante 20 segundos.

Segundo Lurie (1998), para uma determinada espécie de fungo, a inativação dos esporos pelo calor é o resultado da combinação da temperatura e duração do tratamento. Assim, Barkai-Golan & Phillips (1991) afirmam que os esporos de *Alternaria alternata* (Fries) Keissler podem ser inativados tanto a 48°C durante 2 minutos como a 46°C durante 4 minutos.

Os experimentos tiveram como objetivos: a) verificar diferenças de virulência dos isolados de *Botryosphaeria dothidea* em maçãs 'Fuji'; b) verificar a influência do meio de cultura BD na germinação dos conídios de *B. dothidea* *in vitro* e *in vivo*; c) testar o efeito de diferentes temperaturas e períodos de exposição na germinação de conídios e crescimento do micélio de *B. dothidea* *in vitro*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Virulência de isolados de *Botryosphaeria dothidea*

Os 10 isolados de *Botryosphaeria dothidea* foram obtidos a partir de maçãs com sintomas típicos de podridão branca de pomares da região de Vacaria-RS.

Os isolados foram retirados dos frutos e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por 13 dias em câmara BOD a 26°C sob luz fluorescente constante. A partir destes, produziram-se culturas monospóricas dos isolados, segundo o método de Keitt (1925), modificado por Ezekiel (1930) e Lambert (1939).

Para a produção de conídios, os isolados de *B. dothidea* foram transferidos para discos de papel filtro, previamente colocados sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo por 13 dias em câmara BOD a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro contendo os corpos de frutificação, foram retirados das placas de Petri e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de água destilada estéril.

A suspensão de conídios obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com um hemacitômetro e ajustada para  $10^5$  conídios/mL.

A inoculação foi realizada em maçãs cv. Fuji, provenientes de diferentes pomares da região de Vacaria-RS. Inicialmente, as maçãs foram uniformizadas por tamanho (calibre 120) e em seguida foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial), durante um minuto, para

desinfestação da superfície dos frutos. Em seguida, os frutos foram lavados duas vezes com água esterilizada e secados a temperatura ambiente.

As maçãs foram inoculadas pela aspersão da suspensão de conídios ( $10^5$  conídios/mL), através de um atomizador, durante 5 segundos, na região equatorial do fruto. Os frutos inoculados foram acondicionados separadamente em bandejas plásticas. Para manter a umidade, as bandejas foram colocadas dentro de sacos plásticos e incubadas em câmara BOD a 26°C durante 13 dias. Após este período, a avaliação da incidência da doença foi realizada através da contagem do número de lesões causadas por *B. dothidea* nas maçãs 'Fuji'.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 12 repetições, cada repetição correspondendo a uma maçã.

## **2.2.2 Germinação dos conídios de *B. dothidea in vitro* e *in vivo***

### **2.2.2.1 Caldo de batata-dextrose (BD)**

A solução de BD foi preparada com 200g de infusão de batata e 20g de dextrose em 1 litro de água destilada. A partir da solução estoque foram realizadas diluições para as concentrações de 0,024; 0,12; 0,24; 1,2 e 2,4% BD.

### **2.2.2.2 Isolado de *Botryosphaeria dothidea***

O isolado n° 10 foi colocado para crescer em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por 13 dias em câmara BOD a 26°C sob luz fluorescente constante. A partir destes, produziram-se culturas monospóricas dos isolados, segundo o método de Keitt (1925), modificado por Ezekiel (1930) e Lambert (1939).

Para a produção de conídios, o isolado de *B. dothidea* foi transferido para discos de papel filtro, previamente colocados sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo por 13 dias em câmara BOD a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro contendo os corpos de frutificação, foram retirados das placas de Petri e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de água destilada estéril ou 20 mL de caldo BD em diferentes concentrações (T1= suspensão de conídios com água; T2= suspensão de conídios com BD 0,024%, T3= suspensão de conídios com 0,12% de BD; T4= suspensão de conídios com 0,24% de BD; T5= suspensão de conídios com 1,2% BD; T6= suspensão de conídios com 2,4% de BD).

A suspensão de conídios obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com um hemacitômetro e ajustada para  $10^4$  conídios/mL para utilização na avaliação da germinação dos conídios *in vitro* ou ajustada para  $10^5$  conídios/mL para avaliação da germinação dos conídios de *B. dothidea* nos frutos.

### **2.2.2.3 Germinação dos conídios de *B. dothidea in vitro***

Com o auxílio de uma micropipeta, 30  $\mu$ L da suspensão de conídios ( $10^4$  conídios/mL), em diferentes concentrações de BD (0; 0,024; 0,12; 0,24; 1,2 e 2,4% BD), foram distribuídas em placas de Petri com meio ágar-água (0,018:1). As placas foram acondicionadas por 12 horas em câmara BOD a 26°C. Após este período, as placas foram retiradas da BOD e coradas com 0,1% azul de algodão em lactofenol.

A percentagem de germinação dos esporos foi determinada observando-se, ao microscópio, 50 conídios selecionados arbitrariamente em cada placa de

Petri. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo apresentava no mínimo metade do comprimento do esporo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 5 placas de Petri por tratamento.

#### **2.2.2.4 Germinação dos conídios de *B. dothidea in vivo***

A inoculação foi realizada em maçãs cv. Fuji, provenientes de diferentes pomares da região de Vacaria-RS. Inicialmente, as maçãs foram uniformizadas por tamanho (calibre 120) e em seguida foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial), durante um minuto, para desinfestação da superfície dos frutos. Em seguida, os frutos foram lavados duas vezes com água esterilizada e secados a temperatura ambiente.

As maçãs foram inoculadas pela aspersão da suspensão de conídios ( $10^5$  conídios/mL) com diferentes concentrações de BD (0; 0,024; 0,12; 0,24; 1,2 e 2,4% BD), através de um atomizador, durante 5 segundos, na região equatorial do fruto. Os frutos inoculados foram acondicionados separadamente em bandejas plásticas. Para manter a umidade, as bandejas foram colocadas dentro de sacos plásticos e incubadas em câmara BOD a 26°C por 12, 24, 48, 72, 96 horas.

A avaliação da germinação dos conídios nos frutos inoculados foi realizada após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação em BOD a 26°C. Neste caso, após cada intervalo de tempo, retirou-se 2 discos de 1cm de diâmetro da epiderme, na região equatorial das maçãs inoculadas. Com o auxílio de um banho-maria, os discos foram colocados em frascos tipo béquer (50mL) contendo 20mL de lactofenol de Amann, aquecido a 60°C, durante 3 minutos. Após, verteu-se o lactofenol e adicionou-se 30mL álcool etílico (80%) aos

frascos contendo os discos. Estes, permaneceram por aproximadamente 10 minutos em banho-maria a 80°C para descolorir o tecido. Verteu-se o álcool e adicionou-se solução de 0,1 % azul de algodão em lactofenol. Os discos foram montados em lâminas de vidro para análise da germinação dos esporos ao microscópio, contando-se o número de esporos germinados em cada disco. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo apresentava no mínimo metade do comprimento do esporo.

Os tratamentos foram arranjados em bifatorial, em um delineamento experimental completamente casualizado, com 6 repetições, cada repetição correspondendo a uma maçã. O fator período de incubação constou de 5 níveis (12, 24, 48, 72 e 96 horas) e o fator meio BD constou de 6 níveis (0; 0,024; 0,12; 0,24; 1,2 e 2,4% de BD).

### **2.2.3 Germinação dos conídios e crescimento do micélio de *B. dothidea* *in vitro* sob diferentes temperaturas**

#### **2.2.3.1 Isolados de *Botryosphaeria dothidea***

Os isolados do fungo *B. dothidea* (n° 1, 5, 9 e 10) foram crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivados em câmara de crescimento BOD a 26°C sob luz contínua (lâmpada fluorescente) durante sete dias, para a produção de micélio do patógeno.

Para a produção de conídios, os isolados de *B. dothidea* foram repicados em discos de papel filtro que estavam sobre meio de cultura BDA em placas de Petri, permanecendo durante 13 dias a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de água estéril. A suspensão

obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio do patógeno. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com auxílio de um hemacitômetro e ajustada para  $10^4$  conídios/mL.

### **2.2.3.2 Aplicação do calor**

#### **a) Micélio de *B. dothidea***

Para testar o efeito do calor no crescimento do micélio dos isolados (n° 1, 5, 9 e 10) de *B. dothidea*, discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias, preparadas conforme descrito no item 2.2.3.1. Em tubos de microcentrífuga colocaram-se dois discos do micélio e 2 mL de água esterelizada, previamente aquecida em banho-maria, na temperatura correspondente ao tratamento. Os tubos, com os discos da colônia de micélio foram imersos em água com diversas temperaturas, e resfriados em água a 8°C, após diferentes períodos de incubação.

Comparou-se o efeito das temperaturas de 45, 50, 52, 55, 58°C durante 30 segundos e 15°C (temperatura ambiente - testemunha), no crescimento de *B. dothidea*, avaliando-se, 5 dias após a aplicação dos tratamentos, o tamanho das colônias desenvolvidas a partir dos discos tratados.

Após a aplicação dos tratamentos, os discos foram retirados dos tubos e incubados em placas de Petri com meio BDA em estufa BOD a 26°C, durante 6 dias.

Os tratamentos, com três repetições, foram arranjados segundo um bifatorial (isolados e temperatura) num delineamento experimental

completamente casualizado. Cada repetição foi composta por um tubo de microcentrífuga.

#### **b) Conídios de *B. dothidea***

Para testar o efeito do calor na germinação dos conídios de *B. dothidea*, 1mL da suspensão de conídios de cada um dos isolados do patógeno (n° 1, 5, 9 e 10), preparada conforme descrito no item 2.2.3.1, foi colocada em tubos de vidro (30 mL) com 10 mL de água aquecida a 58°C, durante 30 e 60 segundos. Imediatamente, os tubos foram resfriados em água a 8°C.

Com auxílio de uma micropipeta, 30 µL da suspensão de conídios ( $10^4$  conídios/mL) tratados foram distribuídas em placas de Petri com meio BDA. As placas foram acondicionadas por 5 dias em câmara BOD a 26°C. Após este período, as placas foram retiradas da BOD e analisadas quanto a germinação dos conídios.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 repetições. Cada repetição foi composta por uma placa de Petri.

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Virulência dos isolados de *B. dothidea***

Todos os isolados apresentaram patogenicidade, porém variaram em sua virulência (Tabela 1). Os resultados mostraram que houve diferenças significativas no número de lesões causadas pelos diferentes isolados de *B. dothidea* em maçãs 'Fuji'. Estes resultados confirmam relatos anteriores sobre a variação que ocorre na patogenicidade de isolados de *B. dothidea* (Sutton & Boyne, 1983).

TABELA 1. Número de lesões de podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas ( $10^5$  conídios/mL) com diferentes isolados de *Botryosphaeria dothidea*, após incubação a 26°C durante 13 dias, Vacaria, RS, 2003.

Isolado <i>B. dothidea</i>	Número de lesões por fruto*	
1	11,92**	bc***
2	11,83	bc
3	4,50	c
4	7,08	c
5	18,33	ab
6	4,50	c
7	7,50	c
8	8,50	c
9	18,80	c
10	21,00	a

C.V. = 31,8%

\* Lesões maiores que 2mm.

\*\*Valores médios de 12 frutos.

\*\*\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O isolado de *B. dothidea* (10) foi o que apresentou maior virulência, apesar deste não diferir estatisticamente dos isolados números 5 e 9. As maçãs 'Fuji' inoculadas com os isolados de *B. dothidea* (5, 9 e 10) apresentaram valores superiores a 18 lesões da doença/fruto, após incubação a 26°C durante 13 dias.

### 2.3.2 Germinação dos conídios de *Botryosphaeria dothidea* in vitro e in vivo

Nos resultados obtidos após incubação a 26°C (Figura 2), determinou-se um aumento significativo da germinação de conídios do patógeno quando utilizado 2,4% de caldo BD no preparo da suspensão de conídios. Neste caso, aproximadamente 90% dos conídios de *B. dothidea* germinaram após incubação a 26°C durante 12 horas.

Sutton & Arauz (1991) observaram que há diferenças na percentagem de germinação de conídios entre isolado de *B. dothidea*. Após 24 h, a 12°C, um

isolado apresentou germinação de 13,9% dos conídios, enquanto outros isolados apresentavam em média 75% de germinação. Quando a temperatura de incubação aumentou para 16°C ou 24°C, após 12 horas todos os isolados testados apresentaram em média 80% de germinação. A temperatura ótima para a germinação determinada naquele estudo foi em torno de 26°C.

Verificou-se também que, enquanto Sutton & Arautz (1991) encontraram germinação superior a 80% nas suspensões aquosas de conídios deste patógeno, o máximo de germinação obtida neste trabalho foi de 65%. Outros pesquisadores também observaram grande variabilidade na germinação de conídios entre isolados de *B. dothidea*. (Fulkerson, 1960; Sutton & Boyne, 1983). Esta diferença pode ser relacionada a diferente origem dos isolados estudados.

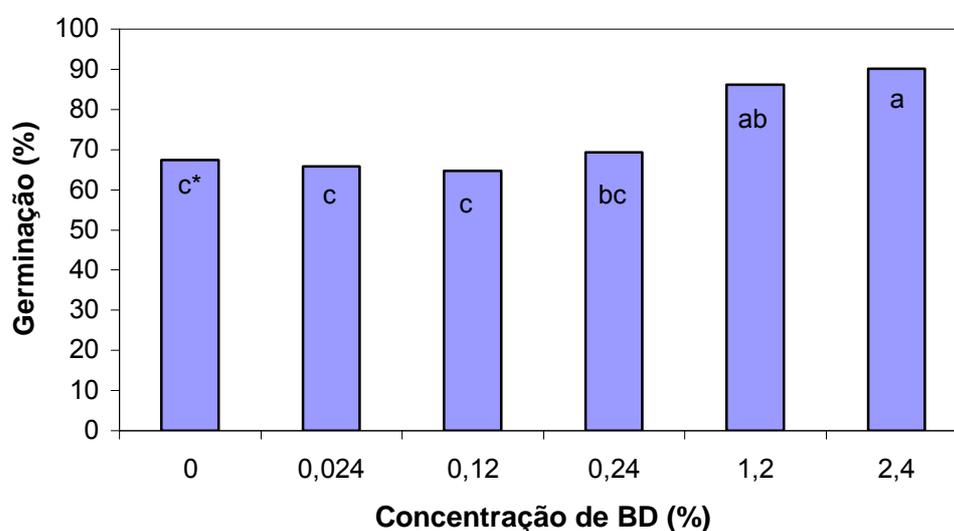


FIGURA 2. Germinação de conídios de *B. dothidea* *in vitro* em diferentes concentrações de batata-dextrose (BD), após 12 h de incubação a 26°C, Vacaria, RS, 2003.

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
C.V. = 10,86%

A análise estatística demonstrou que não houve interação significativa entre a concentração de caldo BD e o tempo de incubação, no caso da germinação dos conídios de *B. dothidea* nas maçãs. Nos resultados apresentados na Tabela 2, verifica-se que 45% dos conídios germinaram nos frutos após 24 h e 91% após 48 h de incubação a 26°C, independente da concentração de caldo BD utilizada na suspensão.

Quando as maçãs foram inoculadas com conídios suspensos em água (Tabela 2) também se verificou um aumento progressivo de conídios germinados a partir da observação feita após 12 h de incubação. Somente 43% dos conídios germinaram após 24 h e, somente após 48 h, a germinação aumentou para 83,6%. Não há relatos deste tipo de estudos com *B. dothidea* e os resultados são de importância para definir estratégias de controle do patógeno.

TABELA 2. Germinação de conídios de *B. dothidea*, suspensos em diferentes concentrações de caldo batata-dextrose (BD), após incubação a 26°C por 12, 24 e 48 horas, em maçãs 'Fuji', Vacaria, RS, 2003.

Incubação (h)*	Concentrações de BD (%)						Médias
	0	0,024	0,12	0,24	1,2	2,4	
12	22,1**	23,1	22,8	25,7	31,5	32,2	26,3 c
24	43,1	42,2	40,7	47,7	47,6	53,4	45,5 b
48	83,6	85,6	90,9	96,9	94,7	98,6	91,7 a
Médias	49,6 e***	50,3 e	51,5 d	56,3 c	57,9 b	61,4 a	

C.V. = 11,8%

\* Com 72 e 96 h de incubação todos os conídios encontravam-se germinados com presença de micélio bem desenvolvido.

\*\* Valores médios de 6 frutos

\*\*\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

O efeito da concentração de caldo BD na germinação dos conídios nas maçãs foi menor do que na germinação dos conídios em água, provavelmente, porque nas maçãs há disponibilidade de nutrientes exsudados pela fruta. Contudo, constatou-se um aumento significativo da germinação quando

acrescentado 0,12 a 2,4% de caldo BD. Este é o primeiro relato que sugere que este patógeno é dependente de nutrientes para sua germinação.

### 2.3.3 Germinação dos conídios e crescimento do micélio de *B. dothidea* *in vitro* sob diferentes temperaturas

Para reduzir o crescimento do micélio de *B. dothidea* foi necessária alta temperatura da água e longa exposição. De acordo com os dados na Tabela 3, houve interação significativa entre a temperatura e o período de exposição no crescimento do micélio de *B. dothidea*. Os menores crescimentos do micélio de *B. dothidea* ocorreram a partir de 62°C, quando expostos a 90 e 120 segundos. Segundo Barkai-Golan & Phillips (1991), a inativação do patógeno é mais efetiva com o aumento da temperatura e tempo de duração do tratamento.

TABELA 3. Diâmetro das colônias de *Botryosphaeria dothidea in vitro* (Isolado 10) submetidas a diferentes temperaturas e períodos de exposição, Porto Alegre, RS, 2003.

Temperatura (°C)	Diâmetro das colônias (mm)				
	Período de exposição (segundos)				
	30	60	90	120	Médias
45	45,70 aA*	36,42 cdAB	31,46 cB	43,07 aA	39,16*
48	48,36 aA	51,49 aA	49,72 aA	48,98 aA	49,64
50	42,45 aA	48,92 abA	46,12 abA	40,89 aA	44,60
52	41,97 aA	46,17 abcA	39,92 abcA	40,38 aA	42,12
55	38,22 aA	38,81 bcdA	32,34 cA	41,79 aA	37,79
58	41,83 aA	36,14 cdA	36,64 bcA	41,93 aA	38,89
60	45,95 aA	31,81 dB	36,48 bcAB	37,02 aAB	37,82
62	41,00 aA	42,62 abcdA	19,25 dB	20,02 cC	30,72
65	43,71 aA	30,89 dB	17,25 dC	15,82 bD	26,92
<b>Médias</b>	43,24	40,65	35,24	34,65	

C.V. = 17,28%

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

Quando se analisa o efeito da temperatura sobre o crescimento do micélio em diferentes isolados de *B. dothidea* (Tabela 4) verifica-se que não houve interação significativa entre isolado e a temperatura de tratamento. O

crescimento do micélio de *B. dothidea* foi menor quando submetido a 58°C durante 30 segundos, porém não diferindo estatisticamente da temperatura de 55°C.

Os fungos apresentam considerável variação na sensibilidade as altas temperaturas e as diferenças entre os isolados podem estar relacionadas a diferenças genéticas, como já constatado em outros patógenos (Sommer et al., 1967).

TABELA 4. Diâmetro das colônias de isolados de *Botryosphaeria dothidea* desenvolvidas a partir de discos de micélio submetidos a diferentes condições de temperatura durante 30 segundos, Vacaria, RS, 2003.

Temperatura (°C)	Diâmetro médio da colônia (mm)				Média
	Isolado				
	1	5	9	10	
45	73,01	78,97	62,25	60,17	68,60 a*
50	72,02	77,39	56,57	66,92	68,22 ab
52	60,42	70,74	63,64	56,13	62,73 ab
55	57,07	58,95	30,64	62,52	52,29 bc
58	29,74	47,45	54,09	47,93	44,80 c
15	66,24	75,36	70,86	62,87	68,83 a
<b>Média</b>	59,75ab	68,14a	56,34b	59,42ab	

C.V. = 18,56%

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

No caso da germinação dos esporos, *B. dothidea* teve a germinação dos conídios inibida quando estes foram submetidos à temperatura de 58°C durante 60 segundos (Tabela 5).

TABELA 5. Germinação dos conídios de *Botryosphaeria dothidea in vitro*, em meio BDA, sob diferentes temperaturas e períodos de exposição, Vacaria, RS, 2003.

Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Isolado			
		1	2	3	4
58	30	+	+	+	+
	60	-	-	-	-
15		+	+	+	+

Legenda: (+) germinado (-) não germinado

A resposta dos patógenos ao calor pode ser influenciada pelo conteúdo de umidade dos esporos, atividade metabólica do patógeno ou seu inóculo, idade do inóculo e composição química e atividade da água do tratamento (Barkai-Golan & Phillips, 1991). A sensibilidade das espécies de fungos é variada, e, assim, Karabulut et al. (2002), relataram que, enquanto o crescimento do micélio de *Monilinia fructicola* foi completamente inibido pela exposição a 50°C durante 10 segundos, o crescimento do micélio de *Penicillium expansum* só foi inibido a 60°C por 20 segundos.

A eficiência do tratamento com calor no patógeno é, normalmente, medida pela redução na viabilidade do organismo, tanto no crescimento do micélio como na germinação do esporo (Lurie, 1998). No caso da germinação dos esporos, os tratamentos com calor teriam efeito direto no patógeno, através da inibição ou retardamento da elongação do tubo germinativo, ou ainda, inativando os esporos (Ferguson et al., 2000).

### 3. CAPÍTULO III

#### **Aspersão de água quente no controle pós-colheita da podridão branca causada pelo patógeno *Botryosphaeria dothidea* em maçã 'Fuji'**

##### 3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da maçã (*Malus domestica* Borkh.) está concentrado na Região Sul do Brasil, sendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul responsáveis por 95% da produção total, especialmente as cultivares Gala e Fuji (Associação Brasileira de Produtores de Maçã, 2004).

As doenças pós-colheita são responsáveis por perdas substanciais de frutos. Estas doenças são o resultado de dois tipos de infecções: a) aquelas resultantes de danos ocorridos durante a colheita e manuseio, ou b) infecções latentes ou quiescentes, iniciadas durante o período de crescimento dos frutos (Bruton, 1994).

A ocorrência e manutenção da latência do patógeno no hospedeiro são o resultado de um equilíbrio entre hospedeiro, patógeno e ambiente, onde não há sintoma visual da doença. As respostas bioquímicas e fisiológicas pós-colheita do hospedeiro podem desencadear mudanças neste equilíbrio e, conseqüentemente, ativar o patógeno. Ao mesmo tempo, o patógeno que se mantinha com um baixo nível metabólico durante a latência, pode ativar fatores de patogenicidade, resultando em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro (Jarvis, 1994; Prusky, 1996).

Nas doenças pós-colheita da cultura da maçã, as de mais difícil controle são a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.), a podridão amarga (*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld.& Schrenk), e a mancha foliar de *Glomerella* (*Glomerella* spp). Estas doenças tornam-se mais evidentes à medida que se aproxima a colheita, quando a utilização de fungicidas é mais restrita.

A doença chamada de podridão branca em maçãs é causada pelo fungo *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. Em anos quentes e chuvosos sua ocorrência é mais severa, podendo causar perdas de até 100% na produção (Brown II & Britton, 1986). O patógeno sobrevive em cancrios de ramos e troncos e frutos mumificados e na primavera inicia a liberação de ascosporos e/ou conídios, os quais irão infectar os frutos em desenvolvimento (Sutton, 1990). Nos frutos, as lesões tornam-se visíveis entre seis e oito semanas antes da colheita. No entanto, a infecção pode ocorrer no início do ciclo vegetativo, permanecendo latente no fruto por um longo período sem manifestar sintomas até o início da maturação (Boneti & Katsurayama, 1999).

O controle químico é o método mais utilizado para o controle de doenças em frutos, tanto em pré-colheita como em pós-colheita. Porém, tendo em vista que os tratamentos com defensivos agrícolas tradicionalmente empregados em pós-colheita não apresentam mais a eficiência de controle que os consagrou, e considerando a possibilidade de se perder mercados potenciais devido à presença de resíduos no fruto que ressurgem, também aqui no Brasil, uma demanda por métodos alternativos de controle de infecções.

Algumas técnicas, sem o uso de produtos químicos, vêm sendo recomendadas para diminuir a incidência de podridões em pós-colheita, como

por exemplo o pré-resfriamento dos frutos logo após a colheita. O armazenamento em baixas temperaturas ou em condições de atmosfera controlada (AC) também diminui a incidência de podridões. O efeito positivo destas técnicas, entre outros, resulta do retardamento do metabolismo do fruto e, conseqüentemente, do amadurecimento, senescência, e da inibição do crescimento de fungos (Agar et al., 1990).

Outra alternativa é a utilização do tratamento com água quente, como forma de controlar patógenos, que já vem sendo testado em diversas espécies frutíferas, tais como: laranja (Couey, 1989), maçãs (Burchill, 1964; Sams et al., 1993; Roy et al., 1994; Lurie, 1998; Fallik et al., 2001), pêssegos (Phillips & Austin, 1982; Karabulut, 2002), nectarinas (Anthony et al., 1989) e pêras (Schirra et al, 1997).

O tratamento com calor pode servir como um substituto do controle químico na pós-colheita, sem causar danos físicos ao fruto (Lurie et al., 1998). Maçãs 'Golden Delicious' expostas a 38°C durante 4 dias após a inoculação com *Penicillium expansum* Link., reduziram as podridões após 3 meses de armazenamento a 0°C sem reduzir a qualidade do fruto (Leverentz et al., 2000).

O tratamento com calor para o controle de patógenos pós-colheita pode ser aplicado aos frutos de várias formas: água quente, vapor quente, ar quente seco, radiação infravermelha e radiação de microondas (Couey, 1989). Na prática, os métodos mais empregados são o vapor quente e água quente (Lurie, 1998).

Os tratamentos com calor podem controlar patógenos pela denaturação de proteínas, liberação de lipídios, destruição de hormônios, hipoxia de tecido,

redução de reservas ou injúrias metabólicas (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Por outro lado, a qualidade dos frutos pode ser afetada através da perda de água, alteração na cor da epiderme, no metabolismo dos açúcares, produção de etileno, danos na epiderme, podendo ainda aumentar a sensibilidade à contaminação por patógenos (Barkai-Golan & Phillips, 1991). Ainda, segundo Kays (1991), as altas temperaturas podem causar efeitos indiretos tais como inibição da síntese de pigmentos, escurecimento da epiderme e colapso de proteínas.

Em adição ao possível efeito letal do aumento da temperatura no patógeno, há um número variado de interações planta-patógeno que podem explicar o decréscimo da podridão (Ferguson et al., 2000). Desta forma, a termoterapia pode ser efetiva na redução da doença através da indução de mecanismos de defesa no hospedeiro, tais como: materiais constitutivos, síntese de fitoalexinas e síntese de várias proteínas. O tratamento com calor é um estresse, e, sendo assim, o tecido vegetal responde na tentativa de aliviar e/ou reparar o dano causado pelo estresse (Lurie, 1998).

Burchill (1964) foi um dos pioneiros no estudo de combinações de tempo e temperatura da água de imersão para o tratamento de doenças em maçãs. O autor testou temperaturas que variaram de 20°C a 55°C, com intervalos de 5°C entre temperaturas, e tempos de 1 a 21 minutos, com intervalos de 6 minutos, tendo como objetivo o controle de *Gloeosporium* sp. Foi observado que nas temperaturas de até 45°C, em todos os tempos, não houve nenhum dano no fruto. Porém, a 50°C, durante 6 minutos, já se visualizavam danos externos nos frutos. O tratamento mais eficiente no controle do *Gloeosporium* sp. foi 45°C durante 10 minutos.

O tratamento com água quente em manga é uma técnica bastante empregada no controle quarentenário. Jacobi & Wong (1991) avaliaram o efeito das temperaturas da água de imersão de 48°C a 56°C, durante 20 minutos, sobre a qualidade dos frutos, e observaram que a partir de 52°C começaram a surgir danos externos e internos.

Mais recentemente, no Brasil, Lunardi et al. (2002) e Lunardi et al. (2003) iniciaram trabalhos sobre o efeito do tratamento com calor no controle pós-colheita da podridão branca e na qualidade de maçãs 'Fuji'. Estes autores verificaram que a imersão de maçã 'Fuji', inoculada artificialmente com *B. dothidea*, em água a 47, 49 e 52°C, durante 1, 2 ou 3 minutos, não controlou eficientemente a podridão causada por este patógeno. Com relação às características qualitativas das maçãs, os autores observaram que o tratamento com calor reduziu a acidez titulável, aumentou os teores de sólidos solúveis totais e pouco influenciou a firmeza da polpa.

Normalmente, o dano mais comum observado nos frutos é o escurecimento da epiderme (Phillips & Austin, 1982; Anthony et al., 1989; Jacobi & Wong, 1991; Schirra et al., 1997), tornando-os inaceitáveis comercialmente. Sendo assim, o grande obstáculo para o uso do calor no controle de doenças pós-colheita está relacionado com a sensibilidade dos frutos às temperaturas necessárias para um efetivo tratamento (Couey, 1989).

As combinações entre o período de exposição e temperatura são a base de um eficiente tratamento com água quente (Nyanjage et al., 1998). Os autores consideram, ainda, que há influência da cultivar, de fatores pré-colheita, entre as combinações de período e temperatura e, a subsequente condição de armazenamento. Neste sentido, as combinações de tempo e

temperatura do tratamento com calor devem ser estabelecidas para cada cultivar, dentro de cada espécie, para cada condição de cultivo.

A tendência de aplicação de tratamentos térmicos é a combinação de menores períodos de exposição com temperaturas mais altas. Trabalhos mais recentes (Fallik et al., 1999; Fallik et al., 2001) tem mostrado que as aspersões de água quente por curtos períodos de tempo a temperaturas mais elevadas controlam satisfatoriamente podridões pós-colheita em diversos frutos. No caso de maçãs 'Golden Delicious' a aspersão de água a 55°C durante 15 segundos, antes do armazenamento, reduziu significativamente o desenvolvimento de podridões, enquanto manteve a qualidade de maçãs 'Golden Delicious' após 4 meses de armazenamento (Fallik et al., 2001). Por outro lado, para um eficiente controle dos patógenos, é necessário maior período de exposição ao calor (Lurie et al., 1998).

As informações são escassas sobre o efeito do tratamento com calor no controle de diversas podridões que ocorrem em maçã na pós-colheita, bem como, a influência deste tratamento na manutenção da qualidade do fruto. As pesquisas realizadas até o momento se baseiam, principalmente, no emprego do vapor quente para o controle de outros patógenos, como *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, e para a manutenção da qualidade dos frutos, principalmente, a firmeza de polpa (Fallik et al., 1999; Klein et al., 1990, 1997).

Os tratamentos alternativos, utilizados para o controle de doenças na pós-colheita de frutas, podem não apresentar a mesma efetividade que os tratamentos convencionais com a aplicação de fungicidas, principalmente, porque aqueles não apresentam efeito residual. Sendo assim, sugere-se que a combinação de métodos alternativos possa ser mais efetiva do que um método

isoladamente. Neste contexto, diversos trabalhos para o controle de doenças pós-colheita dos frutos vêm sendo realizado testando combinações de tratamento com calor associado ao controle biológico (Conway et al. 1999; Leverentz et al., 2000; Leverentz et al. 2003; Karabulut et al. 2002), ou ainda, tratamentos com a utilização de carbonato ou bicarbonato de sódio, sozinhos ou associados com o tratamento com calor, têm controlado satisfatoriamente *Penicillium digitatum* (Pers. Fr.) Sacc. e *Penicillium italicum* Wehmer em citrus (Smilanick et al, 1999; Obagwu & Korsten, 2003; Palou et al, 2002).

O bicarbonato de sódio tem sido utilizado como desinfestante em citrus desde 1920 (Barger, 1928, citado por Obagwu & Korsten, 2003). Recentemente, Palou et al. (2002) relatou a redução de 90% na incidência de mofo azul (*P. italicum*) e mofo verde (*P. digitatum*) em frutos inoculados artificialmente com o patógeno, após a imersão em bicarbonato de sódio a 3%. Não há relatos na literatura de avaliação da termoterapia com aspensão de água aquecida e do carbonato de sódio no controle da podridão branca em maçãs.

O amadurecimento do fruto envolve várias mudanças físico-químicas antes e/ou após a colheita, as quais determinam a sua qualidade para o consumo (Wills et al., 1981). Os sinais visíveis de amadurecimento são mudanças na cor, firmeza, suculência, sabor e aroma que levam ao estágio ótimo para o consumo, sendo estes determinados pelas mudanças na estrutura e metabolismo dos tecidos do fruto (Biale, 1975; Rhodes, 1980).

Diversas pesquisas relacionadas com as práticas pós-colheita foram e continuam sendo realizadas com o objetivo de prolongar a qualidade dos frutos, através do retardo no amadurecimento, senescência, na manifestação

de distúrbios fisiológicos, incidência de podridões e desidratação dos frutos. Influenciam nestes processos o resfriamento, controle da umidade relativa do ar e mudança na composição dos gases do ambiente de armazenamento, haja visto que, estes fatores, isoladamente ou associados, inibem o metabolismo celular e, conseqüentemente, inibem o aparecimento de distúrbios fisiológicos e ocorrência de podridões (Wills et al., 1981).

A função do armazenamento de maçãs é fornecer um ambiente que minimize a deterioração do produto até chegar ao consumidor, além de estender o período de oferta do produto. O manejo da temperatura é tão importante no controle de doenças pós-colheita, que todos os outros métodos têm sido descritos complementares à refrigeração. A refrigeração é o processo mais indicado para prolongar a vida pós-colheita de frutos, bem como, para suprimir o desenvolvimento de podridões (Benato et al., 2001). A condição de redução da temperatura de armazenamento retarda o amadurecimento e a senescência dos frutos e, conseqüentemente, reduzem a suscetibilidade aos patógenos (Sommer, 1985).

O interesse por métodos alternativos para o controle de podridões pós-colheita de frutos, como uma alternativa ao uso de fungicidas, tem aumentado nos últimos anos. Neste sentido, o tratamento com calor antes do armazenamento dos frutos parece ser um dos mais promissores no controle das podridões pós-colheita (Couey, 1989; Klein & Lurie, 1990; Schirra et al., 2000).

A exposição a temperaturas maiores que 35°C tem causado a inibição do amadurecimento em diferentes frutos (Paull, 1990; Lurie, 1998). Tratamento com calor em tomates durante 2 ou 3 dias a 38°C inibiu o amadurecimento e

diminuiu as podridões dos frutos durante o armazenamento (Lurie & Sabehat, 1997). Porritt & Lidster (1978) mostraram que o tratamento com calor (38°C durante 4 dias), antes do armazenamento, reduziu a perda da firmeza da polpa e as podridões causadas, principalmente, por *Penicillium* spp, em maçãs 'Spartan' e 'Golden Delicious'. Resultados similares foram obtidos por Lurie et al. (1998) com maçãs 'Golden Delicious' e 'Ana'.

O efeito do tratamento com calor no fungo poderia ser devido à combinação da capacidade do calor em inativar o patógeno e induzir algum tipo de resistência natural no fruto (Klein & Lurie, 1990; Fallik et al., 1995). Por outro lado, após a remoção do armazenamento, os frutos tratados com calor perderam a firmeza da polpa mais lentamente e apresentaram um aumento na relação sólidos solúveis totais:acidez (Klein & Lurie, 1990; Lurie, 1998). O efeito benéfico do tratamento com calor, neste caso, é, normalmente, devido à atenuação reversível de alguns processos metabólicos, tais como a produção de etileno (Klein & Lurie, 1990).

A resposta do fruto ao tratamento com calor pode ser influenciada por uma combinação de fatores: a idade fisiológica do fruto; tempo e temperatura de exposição ao calor; e destino do produto (será armazenado ou permanece em temperatura ambiente após o tratamento) (Lurie, 1998).

Quanto à idade fisiológica, em geral, frutos recém colhidos exibem considerável resistência aos patógenos. Porém, com o início do amadurecimento e senescência, aumenta a suscetibilidade à infecção (Sommer, 1985). O processo de senescência geralmente reduz as respostas de resistência dos frutos aos patógenos. Isto está, provavelmente, associado com um declínio na habilidade dos tecidos em produzir estruturas e compostos

de defesa (Wilson et al., 1994) e/ou na maior disponibilidade de substrato que os frutos maduros apresentam para os fungos (Fallik et al., 1993).

Este trabalho foi realizado com os objetivos de: a) verificar o efeito do tratamento com calor no controle pós-colheita da podridão branca em frutos de maçãs 'Fuji'; b) verificar o efeito do tratamento com calor associado ao carbonato de sódio no controle pós-colheita da podridão branca em maçãs 'Fuji'; c) verificar o efeito do tratamento com calor combinado com o armazenamento refrigerado no controle pós-colheita da podridão branca, bem como, nos parâmetros físico-químicos de qualidade de maçãs 'Fuji'; d) verificar o efeito do tratamento com calor no controle pós-colheita da doença podridão branca em maçãs 'Fuji' em diferentes estádios de maturação.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Patógeno

O fungo *B. dothidea* foi obtido a partir de maçãs cv. Fuji com sintomas típicos de podridão branca, nos pomares da região de Vacaria, RS, e isolado no Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental da Embrapa – Vacaria, RS. O isolado (n°10) foi crescido em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivado em câmara de crescimento BOD a 26°C sob luz contínua (lâmpada fluorescente), durante 7 dias. A partir destas, produziram-se culturas monospóricas dos isolados, segundo o método de Keitt (1925), modificado por Ezekiel (1930) e Lambert (1939).

Para a produção de conídios, o isolado de *B. dothidea* foi repicado em discos de papel filtro que estavam sobre o meio de cultura BDA nas placas de Petri, permanecendo durante 13 dias a 26°C sob luz fluorescente constante.

Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de meio de caldo batata-dextrose (BD) estéril a 1,2%. A suspensão obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio do patógeno. A concentração de conídios na suspensão foi determinada com um hemacitômetro, e ajustada para  $10^6$  conídios/mL, para posterior utilização na inoculação dos frutos.

### 3.2.2 Frutos

Maçãs cultivar Fuji, colhidas em um pomar do município de Vacaria, RS, foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental da EMBRAPA – Vacaria, RS, onde foram selecionadas por tamanho (calibre 120), e em seguida lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial), durante 1 minuto para desinfestação dos frutos. Em seguida, os frutos foram lavados duas vezes com água esterilizada e secados a temperatura ambiente.

No caso do experimento onde se testou o efeito do tratamento com calor para o controle de *B. dothidea* em frutos de diferentes estádios de maturação, as maçãs foram colhidas em três épocas, com intervalos de 7 dias entre as colheitas. Assim, as maçãs foram classificadas em três estádios (Estádio 1: primeira colheita – fruto verde; Estádio 2: segunda colheita – fruto intermediário; Estádio 3: terceira colheita – fruto maduro), conforme as características físico-químicas dos frutos (Tabela 6).

TABELA 6. Valores iniciais de firmeza da polpa (N), sólidos solúveis totais (%) e acidez titulável (meq ácido málico/100 mL suco) nos diferentes estádios de maturação de maçãs 'Fuji', Vacaria, RS, 2003.

Estádio de maturação	Características físico-químicas dos frutos		
	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100mL suco)
1	82,0	12,0	4,1
2	71,0	13,2	3,2
3	59,0	13,8	2,4

### 3.2.3 Inoculação dos frutos

Com exceção do experimento onde se testou o efeito do tratamento com calor para o controle de *B. dothidea* em frutos de diferentes estádios de maturação, nos demais experimentos as maçãs foram divididas em dois lotes, sendo um lote de frutos inoculados e outro de frutos não inoculados artificialmente com o patógeno.

As maçãs foram inoculadas com o patógeno, através da aspersão de 0,2 mL da suspensão de conídios ( $10^6$  conídios/mL), com auxílio de um pulverizador manual, na região equatorial do fruto. Imediatamente após a inoculação, tanto os frutos inoculados quanto os não inoculados foram acondicionados separadamente em bandejas plásticas. Para manter a umidade, as bandejas foram colocadas dentro de sacos plásticos e então incubadas em câmara de crescimento BOD a 26°C por 24 horas (Experimento 1) ou 48 horas, até o momento da aplicação dos tratamentos com calor.

### 3.2.4 Aplicação do calor

A aplicação do calor nos frutos foi realizada através da aspersão de água quente com um equipamento desenvolvido pela EMBRAPA, Estação Experimental de Vacaria, RS. O equipamento foi acoplado a máquina classificadora de frutos (Figura 3) e foi composto por uma barra com bicos de

aspersão do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015) (Figura 4) distanciados entre si em 10 cm. A distância entre a saída da água do bico e o fruto foi de 5 cm (Figura 5).



FIGURA 3. Detalhe do equipamento para a aspersão da água, acoplado a máquina classificadora de frutos, Vacaria, RS, 2000.



FIGURA 4. Detalhe da barra com os bicos de aspersão de água do tipo leque (Marca Jacto, mod. 110-SF-015), Vacaria, RS, 2000.



FIGURA 5. Detalhe da aplicação dos tratamentos nos frutos através da aspersão da água quente, Vacaria, RS, 2000.

Após a aplicação dos tratamentos com calor, tanto os frutos inoculados quanto os não inoculados foram acondicionados em bandejas plásticas. Para manter a umidade, as bandejas foram colocadas em sacos plásticos e então incubadas em câmara de crescimento BOD a 20°C durante 13 dias ou 17 dias.

Para o experimento de frigoconservação, os frutos foram separados em dois lotes: frutos inoculados e frutos não inoculados artificialmente com o patógeno. Do lote de frutos inoculados, após a aplicação dos tratamentos, uma parte foi incubado em câmara de crescimento BOD a 20°C durante 13 dias. O restante dos frutos (inoculados e não inoculados) foi armazenado em câmara refrigerada a 0-1°C durante 3 ou 5 meses.

### **3.2.5 Tratamentos**

#### **3.2.5.1 Tratamento com calor**

Com exceção do experimento 4, os tratamentos foram arranjados em um bifatorial, segundo um delineamento experimental inteiramente casualizado. O

fator tempo constou de três níveis (30, 60 e 90 segundos de exposição) no experimento 1, dois níveis (30 e 60 segundos) nos experimentos 2 e 3. Já, o fator temperatura, foi composto de cinco níveis, conforme demonstrado na Tabela 7. Os frutos foram aspergidos com água quente ou somente passaram pelas escovas da máquina.

No caso do experimento 4, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (15, 50, 55, 58°C) durante 30 segundos.

As testemunhas constaram de frutos inoculados e não inoculados, as quais não receberam tratamento. Desta forma, a testemunha foi utilizada nos experimentos como um controle qualitativo, portanto, não foram utilizadas na análise estatística.

A unidade experimental constou de 10 frutos com 4 repetições por tratamento (Experimento 1), 20 frutos com 3 repetições (Experimentos 2 e 3) e 15 frutos com três repetições (Experimento 4).

TABELA 7. Relação dos níveis do fator temperatura e fator períodos de exposição utilizados nos diferentes experimentos.

<b>Experimento (nº)</b>	<b>Temperatura da água (°C)</b>	<b>Tempo de tratamento (segundos)</b>
1	15, 45, 50, 55 e sem água (escova)	30, 60 e 90
2	15, 48, 50, 52 e sem água (escova)	30 e 60
3	15, 50, 55, 58 e sem água (escova)	30 e 60
4	15, 50, 55, 58	30

### **3.2.5.2 Tratamento com calor associado ao carbonato de sódio**

Os frutos inoculados e não inoculados com o patógeno permaneceram em estufa BOD a 26°C, durante 48 horas, até o momento da aplicação dos tratamentos (1. 15°C durante 30 segundos; 2. 58°C durante 30 segundos; 3. 58°C durante 60 segundos; 4. 58°C + carbonato de sódio a 3% durante 30 segundos; 5. Carbonato de sódio a 3% durante 30 segundos). O delineamento

experimental foi o inteiramente casualizado com 3 repetições de 50 frutos por tratamento.

### **3.2.5.3 Tratamento com calor em diferentes estádios de maturação dos frutos**

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado em um arranjo dos tratamentos do tipo bifatorial. O fator estágio de maturação constou de três níveis (Estádio 1, Estádio 2 e Estádio 3), e o fator temperatura com calor, foi composto de cinco níveis (controle, 50, 55, 58°C e escova). Neste caso, os frutos foram aspergidos com água quente ou somente passaram pelas escovas da máquina durante 30 segundos. A testemunha (controle) constou de frutos inoculados os quais não receberam tratamento. A unidade experimental constou de 20 frutos com 3 repetições por tratamento.

### **3.2.5.4 Tratamento com calor e armazenamento refrigerado**

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado em um arranjo dos tratamentos do tipo bifatorial. O fator inóculo constou de dois níveis (frutos inoculados ou não inoculados artificialmente). O fator tratamentos com calor foi composto de cinco níveis (15, 50, 55, 58°C e escova). Os frutos foram aspergidos com água quente ou somente passaram pelas escovas da máquina (conforme o tratamento) durante 30 segundos. A testemunha constou de frutos inoculados ou não inoculados os quais não receberam tratamento.

A unidade experimental constou de 20 frutos com 3 repetições por tratamento e a análise estatística foi realizada isoladamente para cada tempo de armazenamento (3 ou 5 meses).

### **3.2.6 Avaliações**

No caso do experimento de frigoconservação de maçãs tratadas com calor, as avaliações de incidência e severidade foram realizadas após 7 dias da saída da câmara fria, a 20°C. Nos demais experimentos, as avaliações de incidência e severidade foram após a incubação dos frutos tratados por 13 dias a 26°C.

#### **3.2.6.1 Incidência da doença**

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados, após 13 dias, através da incidência da doença nos frutos, contando-se o número de frutos com sintomas visuais típicos de podridão branca.

#### **3.2.6.2 Severidade da doença**

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados, após 13 dias, através da severidade da doença contando-se o número de lesões típicas de podridão branca por fruto e medindo-se o diâmetro da lesão (mm), com o auxílio de um paquímetro.

#### **3.2.6.3 Análise físico-química dos frutos**

No início e no final de cada experimento, amostras de 10 frutos, com 4 repetições, foram analisadas em suas características físico-químicas, no laboratório do Departamento de Horticultura –UFRGS.

A análise qualitativa dos frutos foi através da:

- a) Firmeza da polpa: determinada em dois pontos opostos da região equatorial de cada fruto através de um penetrômetro manual com

ponteira de 11 mm de diâmetro. Os valores foram expressos em Newton (N).

- b) Sólidos solúveis totais: determinados com refratômetro de mesa, sendo os valores expressados em %.
- c) Acidez titulável: de cada amostra de frutos foi coletado uma alíquota de 10 ml do suco, que diluído em 90 ml de água destilada foi, posteriormente, titulada com uma solução de NaOH a 0,1 N até pH 8,1. Os valores foram expressos em meq ácido málico/100 ml de suco.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Efeito dos tratamentos sobre a doença podridão branca

##### 3.3.1.1 Incidência e severidade da doença

As análises estatísticas realizadas nos diferentes experimentos revelaram um maior efeito da temperatura sobre a podridão branca do que o efeito do período de exposição dos frutos aos tratamentos. O experimento 1 foi o único que demonstrou efeito significativo do tempo de aplicação do tratamento na redução de frutos infectados com *B. dothidea* (Tabela 8). Neste caso, não houve interação significativa entre o tempo de exposição e a temperatura de tratamento. Independente da temperatura da água, a exposição dos frutos ao tratamento com calor, durante 90 segundos, propiciou as menores percentagens de podridão branca, não diferindo estatisticamente da exposição por um período de 60 segundos.

TABELA 8. Percentagem de podridão branca em frutos de maçãs 'Fuji' inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea* em diferentes períodos de exposição ao tratamento com calor, Vacaria, RS, 2001 (Experimento 1).

Período de exposição (segundos)	Frutos infectados (%)**
30	45,86 a*
60	36,19 ab
90	30,97 b

C.V. = 22,73%

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\*Médias de todas as temperaturas dos tratamentos.

Com relação à severidade da doença, no experimento 1, os menores diâmetros das lesões ocorreram quando os frutos foram aspergidos com água a 55°C ou quando os frutos não foram aspergidos com água e somente passaram pela escova da máquina classificadora, independente do período de exposição a estes tratamentos (Tabela 9).

TABELA 9. Diâmetro (mm) das lesões em maçãs 'Fuji' inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea* após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2001 (Experimento 1).

Temperatura (°C)	Diâmetro (mm)**
15	51,52 a*
45	50,72 a
50	50,30 a
55	46,48 ab
Escova	37,64 b

C.V. = 17,23%

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\*Médias de todas os períodos de exposição ao tratamento com calor.

Como descrito no Capítulo 2, o número de maçãs infectadas com o patógeno *B. dothidea* foi menor quando se utilizou uma suspensão de conídios sem a adição de BD, após 24 horas de incubação. No experimento 1, a suspensão de conídios também não recebeu acréscimo de BD. Sendo assim, o processo de germinação e, conseqüente, infecção dos frutos poderia ser reduzida, explicando desta forma o efeito da escova na remoção dos conídios da superfície do fruto. Além disso, Lurie (1998) afirma que os esporos

germinados são mais sensíveis ao tratamento com calor do que esporos dormentes.

Nos experimentos 2 e 3, a incidência da doença nos frutos não foi influenciada pela temperatura (Tabela 10 e 11) e período de exposição dos tratamentos térmicos (dados não mostrados), tanto em frutos inoculados como não inoculados artificialmente com o patógeno.

TABELA 10. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea* após tratamento com calor, Vacaria-RS, 2003 (Experimento 2).

Temperatura (°C)	Frutos não inoculados		Frutos inoculados	
	Frutos infectados (%)	Diâmetro de lesão (mm)	Frutos infectados (%)	Diâmetro de lesão (mm)
15	28,78a	39,95a*	20,60a	40,11a
48	35,41a	44,43a	32,05a	41,36a
50	33,21a	41,04a	25,59a	47,21a
52	33,08a	44,47a	25,60a	48,48a
Escova	33,60a	37,73a	16,73a	38,41a
C.V. (%)	16,73	12,79	22,52	16,71

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

Por outro lado, a severidade da doença podridão branca foi menor quando os frutos (experimento 3), inoculados artificialmente, foram aspergidos com água a 58°C (Tabela 11), porém, não diferindo estatisticamente do tratamento a 55°C, 15°C e sem água (escova). Apesar disto, verifica-se uma tendência para menor incidência e severidade da doença naqueles frutos que foram tratados com água a 58°C.

Barkai-Golan & Phillips (1991) afirmam que os tratamentos mais efetivos para o controle de doenças pós-colheita em frutos estão entre as temperaturas de 46 e 60°C, com períodos de exposição variando entre 30 segundos e 10 minutos. A tendência na aplicação de tratamentos térmicos para o controle de

doenças pós-colheita é a combinação de menores períodos de exposição com temperaturas mais altas (Lurie et al., 1998). Porém, os resultados obtidos com as temperaturas da água e períodos de exposição utilizadas nos experimentos não foram eficientes para inibir o desenvolvimento do patógeno.

TABELA 11. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea* após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2002 (Experimento 3).

Temperatura (°C)	Frutos não inoculados		Frutos inoculados	
	Frutos infectados (%)	Diâmetro de lesão (mm)	Frutos infectados (%)	Diâmetro de lesão (mm)
15	29,76a*	49,29a	22,70a	51,71ab
48	18,57a	45,86a	15,66a	53,87a
50	26,37a	48,65a	20,09a	47,77 bc
52	16,94a	40,51a	25,36a	44,54 c
Escova	19,03a	49,87a	30,24a	48,67abc
C.V. (%)	22,60	25,30	21,93	8,34

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

No experimento 4, houve efeito dos tratamentos com calor na incidência e na severidade da doença podridão branca nas maçãs. A percentagem de frutos infectados e o número de lesões por fruto foram menores quando se aplicou calor (Tabela 12).

TABELA 12. Percentagem de frutos infectados e número de lesões de podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas com *Botryosphaeria dothidea* após tratamento com calor durante 30 segundos, Vacaria-RS, 2003 (Experimento 4).

Temperatura (°C)	Frutos infectados (%)	Nº lesões/fruto**
15	73,34a*	5,87a
50	53,34ab	2,57 b
55	34,00 b	1,64 b
58	41,00 b	1,56 b
C.V. (%)	21,10	12,50

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

\*\* Lesões maiores que 2mm.

Os resultados do tratamento com calor por aspersão, com algumas exceções, não apresentaram um efeito significativo no controle da podridão branca em maçãs 'Fuji', concordando com Lunardi et al. (2002). Estes autores verificaram que a imersão com água quente, com temperaturas de 47, 49 e 52°C combinadas com períodos de imersão de 1, 2 e 3 minutos não controlaram eficientemente as podridões causadas pelo patógeno *B. dothidea*, inoculado artificialmente em maçãs 'Fuji'.

O tratamento onde os frutos sofreram somente o efeito da escova da máquina classificadora, ou seja, não receberam água por aspersão, tem-se mostrado efetivo na redução da percentagem de frutos infectados (incidência da doença). Estes resultados poderiam sugerir que os tratamentos com calor, nas temperaturas testadas, não apresentaram efeito satisfatório, e a redução na percentagem de podridão branca estaria relacionada à eliminação física do inóculo da epiderme das maçãs. No caso dos trabalhos de Fallik et al. (2001), a menor percentagem de podridões por *Penicillium expansum* nos frutos de maçãs 'Golden Delicious' foi devido à combinação do tratamento com água a 55°C durante 15 segundos com escovas acopladas a máquina de tratamento. Segundo estes autores, isto acarretou redução da população do patógeno da epiderme dos frutos. As escovas ocasionariam a oclusão de fraturas e microferimentos na superfície da epiderme do fruto, dificultando a penetração do patógeno.

Outro grande obstáculo para o uso do calor no controle de doenças pós-colheita está relacionado com a sensibilidade dos frutos às temperaturas necessárias para um efetivo tratamento. Nas temperaturas e períodos de exposição testados, não foram constatados danos aos frutos de maçãs 'Fuji',

relacionados ao tratamento com calor, como por exemplo, o escurecimento da epiderme. Já, Lunardi (2000) trabalhando com tratamento com calor por imersão, verificou que a temperatura de 52°C combinada com os tempos de 10, 15 ou 20 minutos causou danos de escurecimento na epiderme de maçãs 'Fuji', concordando com dados obtidos por outros autores (Phillips & Austin, 1982; Anthony et al., 1989; Jacobi & Wong, 1991; Schirra et al., 1997).

A aplicação do tratamento com calor durante 30 e 60 segundos, associado ou não ao carbonato de sódio, controlou melhor o patógeno *B. dothidea* nos frutos com infestação natural do patógeno (Tabela 13). A percentagem de frutos infectados que apresentaram a doença podridão branca foi menor do que quando se aplicou isoladamente a termoterapia ou a associação desta ao carbonato de sódio. Neste caso, os melhores tratamentos controlaram aproximadamente 90% da doença. Quanto ao diâmetro das lesões, os tratamentos não diferiram estatisticamente.

TABELA 13. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, tratadas com água quente e carbonato de sódio, Vacaria-RS, 2003.

Temperatura (°C)	Frutos com inoculados				Frutos inoculados artificialmente			
	Frutos infectados (%)		Diâmetro de lesão (mm)		Frutos infectados (%)		Diâmetro de lesão (mm)	
15°C	20,14	a*	43,39	a	37,94	a	7,10	a
58°C – 30s	13,96	ab	45,63	a	27,32	bc	2,99	b
58°C – 60s	12,58	ab	51,36	a	17,96	d	3,06	b
58°C – 30s com carbonato de sódio	5,26	b	45,32	a	21,78	cd	3,23	b
Carbonato de sódio	21,26	a	51,30	a	27,96	b	1,83	b
C.V. (%)	17,79		10,64		6,35		10,87	

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

A doença podridão branca é uma das principais doenças que afetam as maçãs. Segundo Brown & Britton (1996) o patógeno *Botryosphaeria dothidea* pode causar perdas muito expressivas, podendo chegar à totalidade dos frutos armazenados. Os resultados confirmam a importância do controle desta doença. Os frutos com infestação natural apresentaram aproximadamente 20% de infecção, mesmo provenientes de pomares que receberam proteção com fungicidas (Tabela 13).

Quando as maçãs foram inoculadas artificialmente com o patógeno *B. dothidea*, a menor percentagem de infecção foi com o tratamento de água quente a 58°C durante 60 segundos. Porém, este resultado não diferiu estatisticamente do tratamento onde se aplicou calor e carbonato de sódio. Cabe ressaltar que no caso da inoculação artificial, a quantidade de conídios nos frutos ( $10^6$  conídios/mL) é maior do que a infestação natural.

A aplicação do tratamento com calor, associado ou não com carbonato de sódio, reduziu o número de lesões por fruto inoculados artificialmente quando comparada com a testemunha. Segundo Palou et al. (2002), os sais de carbonato de sódio teriam um efeito fungistático nos frutos. O aumento da concentração destes sais no citosol poderia ser tóxico para o fungo (Palou et al., 2002).

Os tratamentos com calor teriam efeito direto no patógeno, através da inibição ou retardamento da elongação do tubo germinativo, ou ainda, inativando os esporos (Ferguson et al., 2000). A inativação do esporo presente na superfície do fruto e/ou da infecção quiescente depende da temperatura e do tempo de tratamento, entre outros fatores (Pratella, 1997). Os resultados mostrados no Capítulo 3, confirmam que ocorre inibição no

crescimento do micélio e na germinação dos conídios de *B. dothidea* quando estes foram tratados com calor a 58°C.

Em adição ao possível efeito letal da temperatura no patógeno, há um número variado de interações planta-patógeno que podem explicar o decréscimo da podridão (Ferguson et al., 2000). O tratamento com calor é um estresse e sendo assim, o tecido vegetal responde na tentativa de aliviar e/ou reparar o dano causado pelo estresse (Lurie, 1998).

A severidade da doença podridão branca nos frutos foi influenciada pelo estágio de maturação (Figura 6) e pelo tratamento com calor (Figura 7). A interação entre os fatores não foi significativa sobre a severidade da doença.

O processo de maturação geralmente reduz as respostas de resistência dos frutos aos patógenos (Wilson et al., 1994). Os resultados mostrados na Figura 6 indicam uma tendência para o aumento no número de lesões/fruto quanto mais avançada a maturação das maçãs.

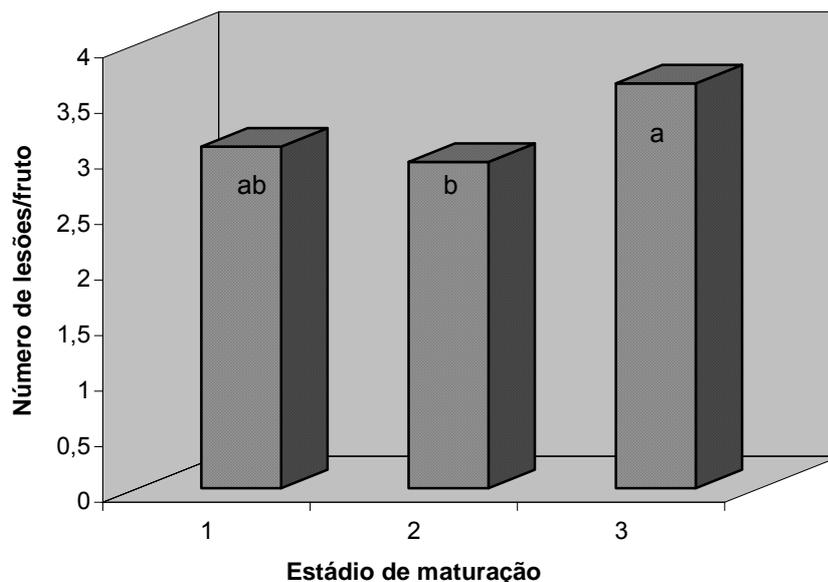


FIGURA 6. Severidade da doença podridão branca em maçãs 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, Vacaria, RS, 2003.

C.V. = 23.19%

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

\*\* Estádio 1: fruto verde; Estádio 2: intermediário; Estádio 3: fruto maduro.

Quando os frutos foram tratados com água a 58°C, o número de lesões por fruto foi menor do que quando tratados com 50°C (Figura 7). Por outro lado, o tratamento onde os frutos sofreram somente o efeito da escova da máquina classificadora não se mostrou efetivo na redução do número de lesões por fruto de maçã em diferentes estádios de maturação. O possível efeito da escova na eliminação física do inóculo, relatado anteriormente, poderia estar mais relacionado à redução da incidência do que a redução da severidade da doença.

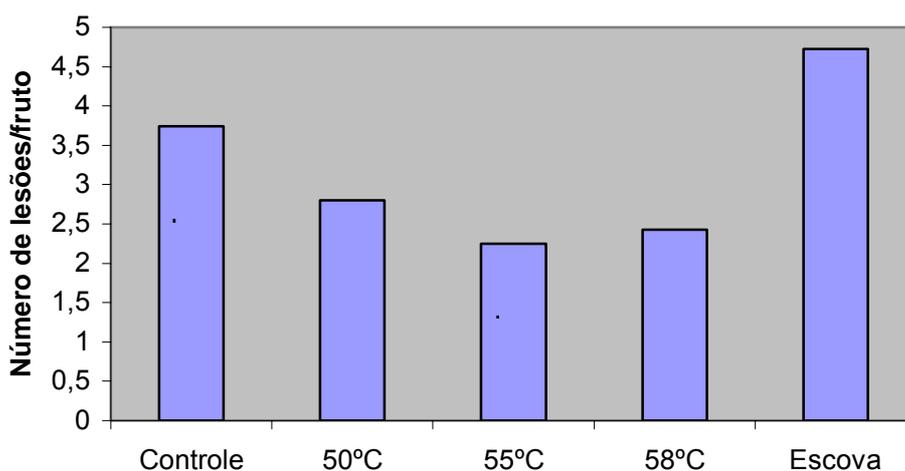


FIGURA 7. Severidade da doença podridão branca em diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor durante 30 segundos, Vacaria, RS, 2003.

C.V. = 23,10%

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

\*\* Médias de todos os estádios de maturação

A incidência da doença foi influenciada pelos efeitos interativos do tratamento com calor e estágio de maturação dos frutos (Tabela 14). Segundo Lurie (1998), a resposta do fruto ao tratamento com calor pode ser influenciada, entre outros fatores, pela idade fisiológica do fruto. Neste sentido, verificou-se que as temperaturas de 55 e 58°C reduziram significativamente a incidência da doença nos estádios onde os frutos não estavam tão maduros. Nos frutos com maturação mais avançada, verificou-se o efeito do tratamento com calor, porém sem diferenças significativas entre as temperaturas de 50 a 58°C (Tabela 14).

Aqueles frutos que não receberam o tratamento ou que os frutos apenas passaram pelas escovas da máquina classificadora apresentaram maior número de frutos infectados em todos os estádios de maturação. Quando se analisam os frutos mais verdes, as temperaturas da água a 55 e 58°C controlaram melhor a incidência da doença.

TABELA 14. Incidência de podridão branca em maçãs 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, Vacaria, RS, 2003.

Tratamentos	Número frutos infectados		
	Estádio 1**	Estádio 2	Estádio 3
Controle	15,33 a AB*	14,00 a B	16,67 a A
50°C	7,67 c A	8,00 c A	7,33 c A
55°C	4,00 d B	3,33 d B	6,33 c A
58°C	3,33 d B	2,67 d B	6,33 c A
Escova	10,67 b A	10,67 b A	10,67 b A

C.V. = 12,30%

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

\*\* Estádio 1: fruto verde; Estádio 2: intermediário; Estádio 3: fruto maduro.

No caso dos frutos incubados a 26°C, durante 13 dias, a incidência e severidade da doença foram influenciadas pela temperatura dos tratamentos. Os frutos tratados com água a 55 e 58°C apresentaram menor incidência da doença. Com relação à severidade, o fato de aplicar o calor diminuiu o número de lesões por fruto (Tabela 15). A redução da incidência e severidade da doença quando os frutos somente passaram pela escova, poderia ser explicado pelo fato da ação destas na remoção dos conídios da superfície das maçãs.

TABELA 15. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' após a incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003.

Tratamento	Nº frutos infectados	Nº lesões/fruto
15°C	17,66 a	5,21 a
50°C	12,33 b	2,64 b
55°C	6,66 c	2,05 b
58°C	7,33 c	2,53 b
Escova	11,33 b	3,15 b
C.V. (%)	10,54	22,40

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

Houve interação significativa entre o fator inoculação e os tratamentos com calor sobre a incidência e severidade da doença, após 3 e 5 meses de armazenamento (Tabelas 16 e 17).

TABELA 16. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas com *Botryosphaeria dothidea*, após 3 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003.

Tratamentos	Nº frutos infectados		Nº lesões/fruto	
	Frutos não inoculados	Frutos inoculados	Frutos não inoculados	Frutos inoculados
15°C	5,00 a B*	12,00 a A	3,50 a A	3,23 bc A
50°C	3,00 b B	4,33 c A	1,83 b B	4,00 a A
55°C	2,66 b B	4,33 c A	3,00 a B	3,54 ab A
58°C	3,33 ab B	5,33 c A	1,38 b B	4,23 a A
Escova	3,33 ab B	7,33 b A	1,70 b B	2,54 c A
C.V. (%)	12,34	15,19	10,56	10,71

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

De forma geral, a incidência e a severidade da doença foi menor nos frutos não inoculados do que naqueles inoculados artificialmente com o patógeno, após 3 e 5 meses de armazenamento refrigerado, em qualquer temperatura de tratamento.

Após 3 meses de armazenamento refrigerado, os frutos inoculados apresentaram menor incidência e severidade da doença quando receberam a aplicação de calor (Tabela 16). Nos frutos não inoculados, o calor também teve efeito positivo no controle da incidência da doença, porém não diferiu do tratamento escova. Comportamento semelhante verificado após 5 meses de armazenamento (Tabela 17).

A aspersão com água a 55 e 58°C, em frutos inoculados artificialmente com o patógeno, acarretou em menor severidade da doença podridão branca, após 5 meses de armazenamento refrigerado. Já, para os frutos não inoculados, não houve diferenças estatísticas na severidade da doença, entre os tratamentos com calor (Tabela 17).

TABELA 17. Incidência e severidade da podridão branca em maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, após 5 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003.

Tratamentos	Nº frutos infectados		Nº lesões/fruto	
	Frutos não inoculados	Frutos inoculados	Frutos não inoculados	Frutos inoculados
15°C	7,00 a B*	9,33 a A	2,76 a A	2,69 ab A
50°C	4,00 ab B	7,66 ab A	1,88 a B	2,81 ab A
55°C	2,33 b B	6,33 ab A	1,86 a A	2,31 b A
58°C	1,33 b B	5,00 b A	1,80 a A	2,18 b A
Escova	3,66 ab B	7,33 ab A	2,22 a B	3,50 a A
C.V. (%)	22,45	27,44	19,70	21,25

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

### 3.3.2 Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade das maçãs 'Fuji'

As análises físico-químicas dos frutos, na instalação dos experimentos estão demonstradas na Tabela 18.

TABELA 18. Características físico-químicas iniciais das maçãs 'Fuji' nos diferentes experimentos, Vacaria-RS, 2000/2003.

Experimento (nº)	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100mL suco)
1	61,18	14,00	2,3
2	59,10	14,10	4,2
3	64,10	14,00	2,1
4	75,50	11,40	2,1

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

Os frutos recém colhidos exibem considerável resistência aos patógenos, porém, com o início do amadurecimento e senescência aumenta a suscetibilidade à infecção (Sommer, 1985). Talvez esta possa ser uma explicação para os baixos índices de controle da podridão branca pela termoterapia com calor, principalmente, naqueles experimentos em que os frutos utilizados já apresentavam um avanço no processo de amadurecimento, como no caso do experimento 2.

TABELA 19. Características físico-químicas em maçãs 'Fuji' inoculadas com *B. dothidea* após tratamento com calor e incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003. (Experimento 3).

Tratamento	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100ml suco)
15°C	72,41 a	12,40 a	2,20 a
50°C	71,41 a	11,86 a	2,00 a
55°C	67,28 a	11,96 a	1,96 a
58°C	72,19 a	13,30 a	2,26 a
Escova	74,77 a	11,10 a	2,00 a
C.V. (%)	5,19	7,51	13,89

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

TABELA 20. Características físico-químicas em maçãs 'Fuji' inoculadas com *B. dothidea* após tratamento com calor e incubação durante 13 dias a 26°C, Vacaria-RS, 2003. (Experimento 4).

Tratamento	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100mL suco)
15°C	74,27 ab*	11,40 a	2,1 b
50°C	75,95 a	11,40 a	2,5 a
55°C	71,73 b	10,93 a	2,0 b
58°C	75,50 ab	12,06 a	2,1 b
C.V. (%)	2,50	7,29	3,96

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

As características físico-químicas das maçãs utilizadas no experimento onde se testou o efeito do tratamento com calor associado ao carbonato de sódio foram: firmeza da polpa de 70,2 N; sólidos solúveis totais de 13,70 %; e acidez titulável total de 3,6 meq ácido málico/ml suco. Neste caso, ao final do experimento, os valores de sólidos solúveis totais e acidez titulável dos frutos não diferiram estatisticamente em relação aos tratamentos aplicados (Tabela 21).

O maior valor de firmeza da polpa foi quando os frutos foram tratados com água quente a 58°C, durante 60 segundos, porém, este valor não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos com calor e carbonato de sódio (Tabela 21). Apesar de diversos trabalhos têm mostrado que a perda de

firmeza da polpa, de frutos de tomate e maçã, pode ser reduzida após a aplicação do calor. (Lurie et al., 1998; Porritt & Lidster, 1978), os resultados apresentados não confirmam esta afirmação.

Os valores iniciais de firmeza da polpa (FP), sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT) das maçãs 'Fuji' tratadas com calor em diferentes estádios de maturação estão demonstrados na Tabela 6.

TABELA 21. Características físico-químicas de maçã 'Fuji' inoculadas com *Botryosphaeria dothidea*, após tratamento com calor associado ao carbonato de sódio, Vacaria, RS, 2003.

Tratamento	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100mL suco)
15°C	68,9 ab*	13,3 a	2,5 a
58°C – 30s	71,2 ab	12,4 a	1,9 a
58°C – 60s	73,9 a	12,1 a	2,1 a
58°C – 30s com Carbonato de sódio	66,1 b	12,8 a	2,2 a
Carbonato de sódio	67,4 b	14,1 a	1,9 a
C.V. (%)	3,62	13,13	16,12

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\* Após os tratamentos os frutos foram incubados durante 13 dias a 26°C.

Os teores de acidez titulável e sólidos solúveis totais não foram influenciados pela temperatura dos tratamentos (Tabela 22), bem como, pelo estágio de maturação dos frutos (Tabela 23). Concordando com os resultados apresentados na Tabela 19, onde os frutos tratados com calor, associado ou não ao carbonato de sódio, também não apresentaram diferenças significativas na acidez titulável e sólidos solúveis totais. Por outro lado, Lunardi et al. (2002) trabalhando com tratamento com calor para o controle de *B. dothidea*, afirmam que o teor de SST foi a variável mais influenciada pelo calor.

TABELA 22. Características físico-químicas de maçã 'Fuji', em diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2003.

Tratamento	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100ml suco)
15°C	73,77 ab	13,70 a	2,31 a
50°C	75,45 a	11,53 a	2,13 a
55°C	70,55 b	10,91 a	1,96 a
58°C	71,73 ab	12,80 a	1,86 a
Escova	74,46 ab	12,43 a	2,16 a
C.V. (%)	3,38	18,14	13,58

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

O possível decréscimo dos teores iniciais de SST verificado ao final do experimento se deve ao consumo de substratos pelo metabolismo respiratório, após degradação dos ácidos orgânicos (Brackmann, 1990, citado por Lunardi et al., 2002).

TABELA 23. Características físico-químicas de maçãs 'Fuji' nos diferentes estádios de maturação, após tratamento com calor, Vacaria, RS, 2003.

Estádio de maturação**	Características físico-químicas dos frutos		
	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100ml suco)
1	74,18 a*	11,98 a	2,26 a
2	71,96 ab	12,50 a	1,97 a
3	71,36 b	12,70 a	2,17 a
C.V. (%)	3,37	18,14	13,58

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\* Estádio 1: fruto verde; Estádio 2: intermediário; Estádio 3: fruto maduro.

Houve efeito da temperatura sobre a firmeza da polpa das maçãs. O tratamento com aspersão da água a 50°C manteve a firmeza da polpa maior, independente dos estádios de maturação dos frutos. A 55°C os frutos apresentaram menor firmeza da polpa, porém, este resultado não diferiu estatisticamente dos tratamentos a 50 e 58°C. A testemunha apresentou valores similares de firmeza da polpa ao tratamento em que os frutos passaram pelas escovas da máquina classificadora sem terem sido tratados com água

(Tabela 22). Estes resultados diferem dos obtidos por Klein & Lurie (1990), os quais afirmam que os frutos tratados com calor perderam a firmeza da polpa mais lentamente.

As características físico-químicas não foram influenciadas pelo fato do fruto ter sido inoculado ou não inoculado artificialmente com o patógeno *B. dothidea*, após 3 meses de armazenamento (0-1°C) mais 7 dias a 20°C (Tabela 24).

TABELA 24. Características físico-químicas de maçãs 'Fuji' inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, após 3 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003.

Tratamento	Firmeza da polpa (N)	Sólidos solúveis totais (%)	Acidez titulável (meq ácido málico/100ml suco)
15°C	66,37 a*	10,22 d	2,05 b
50°C	66,10 a	13,82 a	2,25 a
55°C	67,33 a	12,97 b	1,95 b
58°C	67,83 a	12,60 b	1,95 b
Escova	67,78 a	11,25 c	2,02 b
C.V. (%)	3,78	2,89	3,36

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

Houve efeito do tratamento com calor nos atributos sólidos solúveis totais (SST) e acidez titulável (AT) (Tabela 24). Neste caso, o menor teor de SST foi verificado quando os frutos não receberam a aspersão da água quente. Os maiores valores de SST e AT foram com a aspersão da água a 50°C. Lunardi et al. (2002) também verificaram que o tratamento com calor aumentou os teores de SST em maçãs 'Fuji'.

Após 5 meses de armazenamento, houve efeito interativo dos fatores sobre as características físico-químicas dos frutos. Os frutos inoculados apresentaram menor firmeza da polpa do que os frutos não inoculados com o patógeno, quando tratados com água a 55°C. Já, quando os frutos foram

submetidos ao tratamento onde somente passavam pela escova, a firmeza da polpa foi menor para os frutos não inoculados artificialmente. Para os demais tratamentos com calor, não houve diferenças significativas da firmeza da polpa entre frutos inoculados e não inoculados artificialmente com o patógeno (Tabela 25). Esta variável também foi menor, nos frutos inoculados e tratados com água a 55°C.

TABELA 25. Características físico-químicas de maçãs ‘Fuji’ inoculadas e não inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria dothidea*, após 5 meses de armazenamento refrigerado mais 7 dias em temperatura de 20°C, Vacaria-RS, 2003.

Tratamentos	Firmeza da polpa (N)		Acidez titulável (meq ácido málico/100 mL suco)		Sólidos solúveis totais (%)	
	Frutos não inoculados	Frutos inoculados	Frutos não inoculados	Frutos inoculados	Frutos não inoculados	Frutos inoculados
15°C	56,98 a A	57,16 b A	1,65 ab A	1,65 ab A	13,55 a B	13,85 a A
50°C	57,79 a A	59,15 ab A	1,35 c B	1,65 ab A	13,25 b B	13,55 b A
55°C	57,06 a A	50,43 c B	1,65 ab A	1,75 a A	13,05 b B	13,65 ab A
58°C	57,34 a A	60,33 ab A	1,45 bc A	1,45 b A	12,45 c B	13,85 a A
Escova	54,61 a B	63,88 a A	1,85 a A	1,65 ab B	13,25 b A	12,85 c B
C.V. (%)	4,21	3,11	3,12	4,44	3,50	2,53

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Quando se comparam frutos inoculados com não inoculados artificialmente, a acidez titulável, após 5 meses de armazenamento, foi menor nos tratamentos com água a 50°C, para os frutos não inoculados, e, escova para os frutos inoculados.

Com exceção do tratamento onde os frutos somente passaram pela escova, os frutos não inoculados apresentaram os menores valores de SST, quando comparados com os inoculados artificialmente (Tabela 24). Dentro dos frutos não inoculados, o teor de sólidos solúveis totais foi menor com a aplicação da água a 58°C. Lunardi et al. (2002) verificaram um decréscimo dos SST quando se elevou a temperatura de imersão de 47°C para 49°C, o que poderia ser resultante do aumento da atividade metabólica em condição de

estresse mais pronunciado, de acordo com as conclusões de Hardenburg et al. (1986). Porém, os resultados de SST observados nos frutos inoculados foram contrários a estas conclusões.

## 4. CAPÍTULO IV

### **Isolamento de RNA para estudo da expressão diferencial de genes durante a interação entre frutos de maçã (*Malus domestica* Borkh.) e *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.**

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) representa uma das mais importantes espécies de frutos de clima temperado comercializadas no mundo. No Brasil, mais especificamente na região Sul, onde se concentra a maior parte da produção, a estimativa da safra 2003/2004 é de 1.100.000 toneladas (Associação Brasileira de Produtores de Maçã - ABPM, 2004).

*Botryosphaeria dothidea* Moug. Ces. & De Not. é o agente causal da podridão branca, uma das mais importantes doenças pós-colheita em maçãs. O fungo ascomiceto *B. dothidea* é encontrado em regiões tropicais e temperadas mais quentes (Kim et al., 2001), ocorrendo em uma ampla variedade de espécies, incluindo castanha, pêssego e mirtilo (Travis et al., 2003).

As interações entre plantas e microrganismos patogênicos podem ser classificadas como incompatíveis e compatíveis (Bowler et al., 1992). As interações incompatíveis são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade (RH), a qual é caracterizada pela morte rápida das células no local ou ao redor do ponto de infecção, e pelo não desenvolvimento da doença. Nas interações compatíveis, a RH não ocorre e o

patógeno pode desenvolver-se sem restrições, induzindo o desenvolvimento da doença (Mehdy, 1994).

O estabelecimento da infecção é o resultado de uma complexa interação entre o hospedeiro e o patógeno, envolvendo processos desencadeados no fungo, tais como, a ativação de mecanismos para penetração e colonização do tecido hospedeiro, e na planta, tais como, ativação das respostas de defesa da planta (Benito et al. 1996)

Com relação à resistência vegetal aos microorganismos patogênicos, esta é caracterizada por sua natureza dinâmica e coordenada. Trata-se de um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (Pascholati & Leite, 1995). Esta resistência baseia-se em parte, em uma grande variedade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da deposição do inóculo ao sítio de infecção. Essas defesas pré-existentes são denominadas de constitutivas, inespecíficas ou estáticas (Sticher et al., 1997). Por outro lado, as plantas possuem outros mecanismos de defesa que, aparentemente, permanecem inativos, expressando-se, após serem elas expostas a agentes de indução. Nesse caso, a resistência é chamada de induzida (Agrios, 1997; Sticher et al., 1997).

Em ambas as categorias, os fatores podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos, dependendo do modo primário de atuação sobre o patógeno (Agrios, 1997). Os fatores estruturais atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que os bioquímicos ocorrem nas células do hospedeiro, produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas para o crescimento do

mesmo no interior da planta (Pascholati & Leite, 1995). Entre os fatores constitutivos estruturais pode-se citar: cutícula, tricomas, estômatos, fibras ou vasos condutores, e entre os bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fitotoxinas, e enzimas hidrolíticas (quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases). Dentre os fatores induzíveis estruturais estão: a formação de papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses, e dentre os bioquímicos estão: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (proteínas -PR) e a explosão oxidativa (Lucas, 1998; Pascholati & Leite, 1995).

Embora o controle de *B. dothidea* possa ser realizado através de produtos químicos como os fungicidas, o possível aparecimento de raças resistentes, bem como, a maior preocupação do consumidor com a presença de resíduos químicos, pela utilização de agrotóxicos, tem levado ao desenvolvimento de novas técnicas para o controle desta doença.

As técnicas mais promissoras, utilizadas para o controle de *Penicillium expansum* Link. e *Botrytis cinérea* Pers.:Fr na pós-colheita são a termoterapia com calor, a utilização de cloreto de cálcio e o controle biológico com microorganismos antagonistas (Conway et al, 1999). No caso de *B. dothidea*, os estudos sobre técnicas alternativas para o controle deste patógeno na pós-colheita de maçãs são escassos. Por outro lado, são mais escassas ainda as informações sobre as bases bioquímicas e moleculares da interação fruto-patógeno, as quais poderiam auxiliar no entendimento do processo de infecção do fungo, bem como, nos mecanismos de defesa do fruto.

O modo de ação primário da termoterapia com calor é eliminar os esporos de fungo através da desinfestação da superfície do produto ou da

letalidade do patógeno devido ao aumento da temperatura (Lurie, 1998). No entanto, em adição ao possível efeito primário do calor ao patógeno, vários trabalhos têm demonstrado que a termoterapia com calor pode ser efetiva na redução da doença através da indução de mecanismos de defesa (Fallik et al., 1995, Ferguson et al., 2000; Lurie, 1998; Pratella, 1997). O tratamento com calor é um estresse e sendo assim, o tecido vegetal responde na tentativa de aliviar e/ou reparar o dano causado pelo estresse (Lurie, 1998).

Segundo Pratella (1997), a termoterapia, antes do armazenamento, pode, em alguns casos induzir a formação de fitoalexinas, como por exemplo, escoparone em limão. Tanto nos casos de doenças pós-colheita originadas por danos físicos como as doenças latentes, compostos antimicrobianos naturais, produzidos pelo hospedeiro, tem papel importante no mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de podridões.

Segundo Pavoncello et al. (2001), dois grupos de proteínas podem ser ativados pelo tratamento com calor, as quais induziriam a resistência no fruto: proteínas de choque de calor (HSPs) e proteínas relacionadas com a patogênese (PRs). As HSPs compreendem um grupo diversificado de proteínas, entre 15 a 115 kDa, as quais são expressadas em todos os organismos em resposta a elevadas temperaturas. A expressão de genes HSP e a síntese de proteínas estão associadas com o aumento da exposição ao calor de várias partes das plantas, inclusive os frutos (Ferguson et al. 2000).

As proteínas PR, codificadas por genes do hospedeiro são induzidas pela infecção do patógeno e apresentam um papel na defesa contra uma ampla variedade de patógenos. As proteínas PRs mais caracterizadas são as enzimas que tem atividade  $\beta$ -1,3- glucanase e quitinase. Ambas hidrolisam

polímeros da parede celular do fungo e, portanto, estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra a infecção fúngica (Lurie, 1998). Porat et al. (2000) sugeriram que o tratamento com calor induziu a síntese de PRs como a quitinase e a  $\beta$  - 1,3 glucanase em uva 'Star Ruby' e conferiu maior resistência contra o patógeno *Penicillium digitatum*.

Tanto os fungos patogênicos expressam grupos de genes envolvidos no estabelecimento da infecção, como outros genes são expressos no hospedeiro como resposta. A regulação dos genes de patogenicidade envolve uma complexa troca de sinais entre o hospedeiro e o patógeno (Dixon & Lamb, 1990). O sucesso da infecção por microrganismos patogênicos requer ligação à superfície do hospedeiro, degradação das barreiras químicas e físicas do hospedeiro, produção de toxinas e inativação das defesas da planta (Lamb et al., 1989).

Embora nas interações compatíveis o hospedeiro seja incapaz de parar o processo de infecção, é possível isolar os genes envolvidos com a patogenicidade do fungo e os genes envolvidos nas respostas de defesa do fruto (Sánchez-Torres & González-Candelas, 2003). A expressão gênica de uma célula reflete todos os processos metabólicos que ocorrem na mesma. Portanto, o estudo de genes com expressão diferencial é de grande importância, pois permite identificar quais genes são induzidos ou reprimidos em determinada condição e, conseqüentemente, quais os reflexos no metabolismo da célula. Neste sentido, uma das técnicas utilizadas para a identificação de genes que são regulados durante as interações planta-patógeno é o Differential Display (DD) RT-PCR, desenvolvida por Liang & Pardee (1992).

A análise molecular das interações necessita do isolamento de RNA purificado dos tecidos da planta e/ou patógeno. Diversos protocolos já foram descritos para o isolamento de RNA de tecidos vegetais. Métodos convencionais envolvem o uso de detergentes tais como sulfato dodecyl sódio (SDS) (Taylor & Powell, 1982), precipitações com cloreto de lítio (Thompson et al., 1983), extrações com fenol quente e frio (Galau et al., 1981; Morgens et al., 1987; Verwoerd et al., 1989), entre outros. Por outro lado, López-Gómez & Gómez-Lim (1992) desenvolveram um método para extração de RNA de frutos de manga baseado no uso de tris-ácido bórico e precipitação com etanol 20%.

Utilizando dois protocolos de isolamento, este trabalho teve como objetivo isolar o RNA total de frutos de maçã cv. Fuji inoculadas ou não com o patógeno *Botryosphaeria dothidea* após termoterapia com calor, além de verificar a expressão de genes que são regulados durante a interação maçã-*B. dothidea* através da utilização de DD/RT-PCR.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Patógeno

O fungo *Botryosphaeria dothidea* foi obtido a partir de maçãs cv. Fuji com sintomas típicos de podridão branca no Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental da Embrapa – Vacaria, RS. O isolado foi colocado em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e cultivado em câmara de crescimento BOD a 26°C sob luz contínua (lâmpada fluorescente) durante sete dias.

Para a produção de conídios, o isolado de *B. dothidea* foi repicado em discos de papel filtro que estavam sobre o meio de cultura BDA nas placas de

Petri, permanecendo por 15 dias a 26°C sob luz fluorescente constante. Após este período, os papéis filtro foram retirados das placas e triturados, em almofariz, juntamente, com 20 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD) estéril a 5%. A suspensão obtida foi filtrada através de 3 camadas de gaze para a remoção dos resíduos de micélio do patógeno.

A concentração de conídios na suspensão foi determinada com um hemacitômetro e ajustada para  $10^6$  conídios/ml, para posterior utilização na inoculação dos frutos.

#### **4.2.2 Inoculação dos frutos**

Maçãs cultivar Fuji, provenientes de um pomar do município de Vacaria, RS, foram levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental da EMBRAPA – Vacaria, RS, aonde foram selecionadas por tamanho e em seguida lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial), durante 1 minuto para desinfestação. Em seguida, os frutos foram lavados duas vezes com água esterilizada e secados a temperatura ambiente.

Para a inoculação com o patógeno, as maçãs foram aspergidas, durante 5 segundos, com a suspensão de conídios, na região equatorial do fruto. Imediatamente após a inoculação, tanto os frutos inoculados quanto os não inoculados foram acondicionados em bandejas plásticas. Estas foram embaladas em sacos plásticos e então incubadas em câmara de crescimento BOD a 26°C durante 48 horas.

### 4.2.3 Aplicação do calor

Após a inoculação dos frutos e incubação destes por 48 h, parte dos frutos recebeu a aplicação de calor, através da aspersão de água quente a 58°C durante 30 segundos (conforme metodologia descrita no Capítulo 4).

Os frutos foram levados no mesmo dia para o Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre, RS e mantidos a temperatura ambiente (20°C). Após 24 e 72 horas da aplicação do tratamento com calor, as amostras foram coletadas. As amostras foram compostas por 16 discos com 1 cm de diâmetro e 0,5 cm de profundidade (quatro discos de cada fruto, de um total de 4 frutos por repetição), retirados da epiderme na região equatorial das maçãs. Os discos foram colocados em tubos de microcentrífugas e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Todo material foi armazenado em ultrafreezer a -80°C para posterior utilização no isolamento do RNA.

### 4.2.4 Tratamentos

Os tratamentos foram arranjados em um trifatorial, onde o fator inoculação constou de dois níveis: frutos inoculados com *B. dothidea* e frutos não inoculados com o patógeno. O fator calor foi composto por dois níveis: frutos que receberam termoterapia com calor a 58°C e frutos que não receberam termoterapia com calor. O terceiro fator, tempo, constou de dois níveis: 24 e 72 horas após a aplicação da termoterapia. Os tratamentos foram repetidos duas vezes com quatro frutos por repetição, em um delineamento experimental completamente casualizado.

## **4.2.5 Isolamento de RNA total**

### **4.2.5.1 Isolamento de RNA segundo o Laboratório Fitopatologia Molecular (LFM) – UFRGS**

O protocolo de isolamento de RNA de tecidos vegetais utilizados pelo LFM – UFRGS está baseado nos procedimentos padrões recomendados por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações.

Em nitrogênio líquido, amostras de 200 mg de frutos de maçãs foram trituradas em almofariz e colocadas em tubos de microcentrífuga (0,5 mL) com 400 µl de tampão (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 200 mM, EDTA 15 mM e SDS 0,5%), 2,3 µl de mercaptoetanol, 400 µl de fenol e 80 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizadas em vórtex por 2 minutos. Após acrescentar 28 µl de acetato de sódio (3M) e homogeneizar em vórtex por um minuto, as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos, e em seguida centrifugadas a 16.000 g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido em outro tubo, ao qual foi acrescentado 400µl de fenol e 80 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização em vórtex por 2 minutos e centrifugação a 16.000 g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi colocado em um novo tubo, acrescentando-se a este, 500 µl de isopropanol. As amostras foram incubadas a -20°C por uma hora, e então, centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante removido.

Adicionou-se ao precipitado 500 µl de etanol 70% e centrifugou-se a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi removido e secou-se o precipitado em temperatura ambiente. A precipitação do RNA foi

conduzida acrescentando-se 82,5  $\mu$ l de água ultra pura ao precipitado e incubando-o por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir adicionou-se  $\text{LiCl}_2$  para uma concentração final de 2,5 M. Os tubos foram incubados durante 12 h a 4°C.

Após a centrifugação a 14.000 g por 10 minutos a 4°C e posterior descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 500  $\mu$ l de etanol 70%. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. A ressuspensão do RNA foi realizada secando-se o precipitado à temperatura ambiente por 5-10 minutos e em seguida acrescentado-se 50  $\mu$ l de água ultra pura.

#### **a) Modificações realizadas no protocolo**

Na tentativa de se obter uma quantidade adequada de RNA, paralelo aos procedimentos descritos no item anterior, conduziu-se o isolamento do RNA com duas modificações do protocolo:

1. A quantidade de amostra (400 mg) e o volume dos reagentes foram duplicados;
2. Para a ressuspensão do RNA foi utilizado 40  $\mu$ l de água ultra pura.

#### **4.2.5.2 Isolamento de RNA segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992)**

Amostras de 200 mg de frutos de maçãs, em temperatura ambiente, foram trituradas em almofariz e colocadas em um tubo de microcentrifuga (0,5 mL) com 600  $\mu$ l de tampão (Tris-HCl 150 mM pH 7,5, EDTA 50 mM, SDS 2,0%) e 6,0  $\mu$ l de mercaptoetanol. Em seguida acrescentou-se etanol absoluto (25% do volume da amostra) e acetato de potássio (5M) (11% do volume da

amostra), homogeneizando a mistura no vórtex por 1 minuto. Após acrescentar clorofórmio/álcool isoamílico (49:1) na proporção de 1:1 da amostra e homogeneizar no vórtex por 1 minuto, a mistura foi centrifugada a 20.000 g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo, acrescentando-se a este, fenol:clorofórmio (1:1), na proporção de 1:1 da amostra. A mistura foi levada ao vórtex por um minuto e centrifugada a 20.000g por 10 minutos a 4°C. Novamente, retirou-se o sobrenadante, acrescentando-se a este, clorofórmio/álcool isoamílico (49:1), na proporção de 1:1 da amostra. Após a centrifugação a 20.000g por 10 minutos a 4°C, foi adicionado ao sobrenadante 150 µl de LiCl, precipitando o RNA durante 12 h a -20°C.

O sobrenadante foi descartado após centrifugação a 20.000g por 90 minutos a 4°C e o precipitado lavado com 500 µl de LiCl (3M), invertendo-se lentamente o tubo.

O RNA foi ressuspensionado em 50 µl de água ultrapura e em seguida adicionado acetato de potássio (concentração final 0,3 M) e 110 µl de etanol absoluto, a mistura foi incubada durante 12 h a -20°C. Após a centrifugação a 20.000 g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 75%, centrifugado a 20.000 g por 10 minutos a 4°C (duas vezes), e o RNA ressuspensionado em 30 µl de água ultra pura.

#### **4.2.6 Quantidade e qualidade do RNA total**

A concentração de RNA total foi estimada por espectrofotometria a 260nm (1 OD<sub>260</sub> = 40µg de RNAmL<sup>-1</sup>). A qualidade do RNA foi determinada através das razões A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub>. A integridade do RNA foi verificada através de

eletroforese em gel de agarose 1,5% - TBE 1,0X (Tris 400mM pH , ácido bórico 400mM, EDTA 10mM), utilizando-se brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para visualização do mesmo (Sambrook et al., 1989).

#### **4.2.7 Análise da expressão dos genes através de Differential Display - RT-PCR**

##### **4.2.7.1 Síntese da primeira fita de cDNA**

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada testando duas quantidades de RNA total de cada tratamento (1  $\mu\text{g}$  e 5  $\mu\text{g}$  de RNA total). Em um tubo de microcentrifuga (0,2 mL) foi adicionado 2,3  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  de RNA, 1  $\mu\text{L}$  de tampão (5X) (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ) 0,17  $\mu\text{L}$  de mix deoxinucleotídeos (10mM cada), 0,33  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1M), 0,33  $\mu\text{L}$  de dTA (5'AAGCTTTTTTTTTTTTA3') ou dTC (5'AAGCTTTTTTTTTTTTC3') ou dTG (5'AAGCTTTTTTTTTTTTG3') (20  $\mu\text{M}$ ) (três combinações de iniciadores), 0,17  $\mu\text{L}$  da enzima MMLV transcriptase reversa (Amersham Life Science) e 0,7  $\mu\text{L}$  de água ultra pura para completar o volume de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas por uma hora a 37°C.

##### **4.2.7.2 Reação de PCR para amplificação das seqüências**

Para a amplificação foram adicionados os seguintes componentes em um tubo de microcentrifuga: 5  $\mu\text{L}$  de tampão (10X) para PCR (200mM de Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl); 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM); 1  $\mu\text{L}$  de mix deoxinucleotídeos (10mM cada); 2  $\mu\text{L}$  de dTA (5'AAGCTTTTTTTTTTTTA3') ou dTC (5'AAGCTTTTTTTTTTTTC3') ou dTG (5'AAGCTTTTTTTTTTTTG3') (20  $\mu\text{M}$ ); 2  $\mu\text{L}$

de oligo 3 (5'AAGCTTCGGCATA3'); 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µL); 5 µL de cDNA da reação anterior; 32,7 µL de água ultra pura.

As condições da reação de PCR foram: 95°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 90 segundos e 72°C por 5 minutos, num total de 39 ciclos.

Os produtos das reações de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% - TBE 1X (Tris 400mM, ácido bórico 400mM, EDTA 10mM), utilizando-se brometo de etídio ( $0,5\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para visualização do mesmo (Sambrook et al., 1989).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Isolamento do RNA total

O isolamento do RNA total foi realizado em todas as amostras dos tratamentos estabelecidos no item 4.2.4.

Os protocolos para isolamento do RNA podem ser avaliados pela quantidade, qualidade e integridade do RNA obtido. Neste sentido, para os dois protocolos de isolamento de RNA testados, a produção de RNA total foi baixa. Como mostra a Tabela 26, a quantidade de RNA total por grama de tecido de maçã variou de 20-30µg/g de tecido fresco.

Quando se comparam os protocolos, o método de isolamento utilizando o protocolo do LFM – Ufrgs produziu maior quantidade de RNA total (30µg/g tecido fresco), porém, ainda assim, valor considerado baixo. A razão de absorbância A260 / A280 foi igual a 1,6.

Quando utilizado o protocolo segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992), recomendado para a extração de RNA de frutos, tanto a produção de

RNA total (20 $\mu$ g/g de tecido fresco) como a razão A260 / A280 foi baixa (1,3) (Tabela 26), mesmo com duas precipitações adicionais com LiCl, indicando contaminação com proteínas e pectinas. Estes resultados diferem dos obtidos por estes autores quando trabalharam com a extração de RNA total de mesocarpo de manga, onde obtiveram 60-70 $\mu$ g RNA/g de tecido fresco. Por outro lado, Valderrama-Cháirez et al. (2002) trabalhando com extração de RNA em cactus, utilizando este mesmo protocolo, obtiveram uma baixa produção (30 $\mu$ g RNA/g tecido fresco).

Além da baixa produção de RNA verificada nos dois protocolos, as razões de absorbância A260 / A280 apresentaram valores que indicam contaminação das amostras com proteínas ou ainda, polissacarídeos e compostos fenólicos (Asif et al. 2000).

O isolamento de RNA é um pré-requisito para o estudo da expressão de genes em estudos de biologia molecular e tem um importante papel nas pesquisas sobre fisiologia e genética dos frutos. Por outro lado, o isolamento de RNA de boa qualidade parece ser difícil em tecidos que apresentam altas quantidades de polissacarídeos e compostos fenólicos, tais como frutos de maçã, pêra e banana (De la Cruz et al., 1997; Hu et al., 2002). A presença destas substâncias poderia afetar a qualidade e quantidade do RNA isolado (Asif et al., 2000).

TABELA 26. Características de absorbância e produção de RNA, de frutos de maçã, obtidos através de dois métodos de isolamento, Porto Alegre, RS, 2003/2004.

<b>Protocolo</b>	<b>A260 / A280</b>	<b>Produção RNA (<math>\mu</math>g/g peso fresco)</b>
Lab. Fitopatologia Molecular – UFRGS	1,6	30 $\pm$ 5
López-Gómez & Gómez-Lim (1992)	1,3	20 $\pm$ 6

\* Valores apresentados são os resultados da média de 16 amostras.

Os dois protocolos de isolamento para RNA testados são baseados em métodos de extração com fenol/SDS. Segundo Zeng & Yang (2002) estes métodos produzem, em tecidos com altas quantidades de polissacarídeos e compostos fenólicos, precipitados escuros e insolúveis em água. De forma geral, os precipitados obtidos nos protocolos testados apresentavam coloração escura, assim como citado por estes autores.

Segundo Asif et al. (2000) e Logerman et al. (1987), durante a fase de amadurecimento de frutos de banana e manga, o amido insolúvel é transformado em polissacarídeos solúveis, os quais, apresentam propriedades físico-químicas semelhantes aquelas do RNA. Estes polissacarídeos solúveis poderiam co-precipitar e contaminar o RNA durante a extração e, conseqüentemente, afetam a produção e a qualidade do mesmo. Ainda, os compostos fenólicos são rapidamente oxidados a quinonas, que facilmente se ligam a macromoléculas como os ácidos nucleicos. (Noonberg et al., 1995; Su & Gibor, 1988). Estas características poderiam explicar a baixa produção do RNA observada nos dois protocolos testados.

A integridade do RNA, verificada através de gel de agarose (1,5% - TBE 1,0X), é mostrada na Figura 8. Neste caso, o gel foi analisado utilizando-se 10 $\mu$ g de RNA isolado da polpa + epiderme do fruto de maçã. O isolamento do RNA utilizando o protocolo segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992) não apresentou bandas de RNA ribossomal, quando analisado em gel de agarose, sugerindo que o RNA foi degradado durante as extrações (Figura 8B).

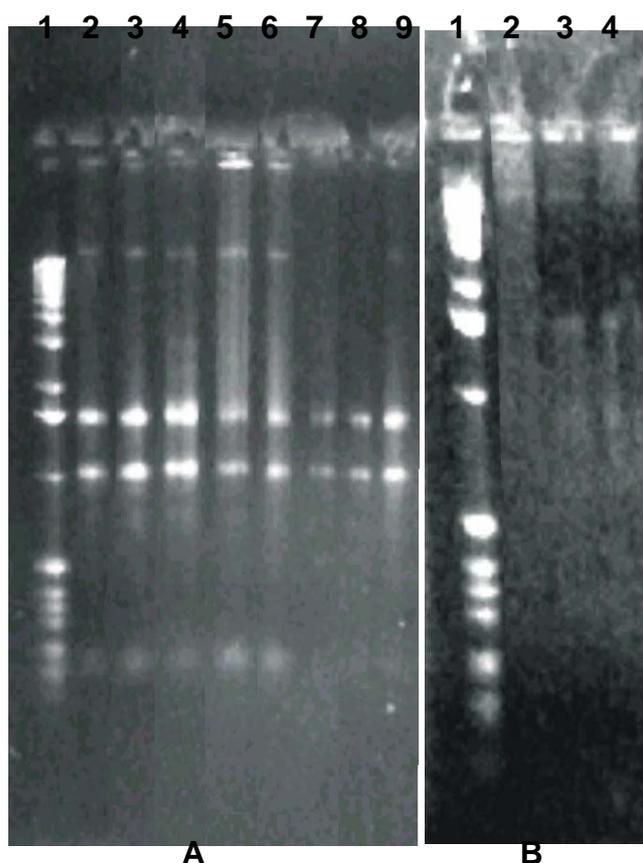


FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose do RNA total de epiderme + polpa de maçã 'Fuji'. O RNA total foi separado em gel de agarose (1,5%) não desnaturante contendo brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. (A) Amostras de RNA extraídas segundo o protocolo LFM-UFRGS (B) Amostras de RNA extraídas segundo López-Gómez & Gómez-Lim (1992). Linha 1. marcador 1Kb (Gibco BRL)

No caso do isolamento de RNA pelo método do LFM – Ufrgs, a análise por eletroforese com gel de agarose mostrou, em todas as linhas, duas bandas distintas correspondendo a 28S e 15S do RNA ribossomal. Apesar de 98% do RNA total ser representado por RNA ribossomal, a integridade de uma amostra pode ser determinada pelo RNA total (López-Gómez & Gómez-Lim, 1992).

### 4.3.2 Análise da expressão dos genes através de Diferencial Display/RT-PCR

O RNA total de frutos de maçã, inoculadas ou não com o patógeno *Botryosphaeria dothidea* após termoterapia com calor, foi utilizado neste trabalho para verificar a expressão de genes que são regulados durante a interação maçã-*B. dothidea* através da utilização de DD/RT-PCR. Associado a isto, o RNA total usado com template para DD/RT-PCR serve para determinar a aceitabilidade do protocolo de extração do RNA.

A transcrição reversa foi realizada com o RNA total extraído dos frutos de todos os tratamentos estabelecidos no item 4.2.4.

Os produtos das reações de RT-PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% - TBE 1X, utilizando-se brometo de etídio para visualização do mesmo. Para qualquer método de isolamento de RNA adotado neste trabalho não foi possível a visualização de bandas nos géis de agarose.

Os resultados obtidos no RT-PCR evidenciam que os protocolos utilizados não produziram RNA de alta qualidade e desta forma inviabilizam a transcrição reversa e a obtenção de uma biblioteca de cDNAs e, conseqüentemente, a análise da expressão diferencial dos genes em frutos de maçã-*B. dothidea*.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Isolados de *Botryosphaeria dothidea*, agente causal da podridão branca em maçã, podem ser encontrados na natureza com diferentes graus de virulência;
- b) A germinação dos conídios e o crescimento do micélio de *Botryosphaeria dothidea in vitro* são afetados pela aplicação de tratamentos com calor;
- c) A aplicação do tratamento com calor com temperaturas superiores a 55°C por até 90 s, associado ou não ao carbonato de sódio a 3%, reduz os sintomas de podridão branca em maçãs 'Fuji', porém, estes tratamentos não são suficientes para controlar com eficácia a doença, tanto em frutos não armazenados como naqueles armazenados sob refrigeração por até 5 meses.
- d) Maçãs 'Fuji' tratadas com aspersão de água quente até 58°C por 60 s não apresentam alterações significativas de sólidos solúveis totais, acidez titulável total e firmeza da polpa após 5 meses de armazenamento refrigerado (1°C);
- e) O tratamento com calor tem maior efeito sobre a incidência de podridão branca em maçãs 'Fuji' quando os frutos apresentam estágio menos avançado de maturação;
- f) A análise da expressão dos genes regulados durante a interação maçã-*Botryosphaeria dothidea* pode ser realizada através da técnica de

Differential Display/RT-PCR, desde que o RNA extraído e utilizado no processo apresente alta qualidade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, T.; GARCIA, J. M.; MIEDTKE, V. et al. Effect of high CO<sub>2</sub> and low O<sub>2</sub> concentrations on the growth of *Botrytis cinerea* at different temperatures. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 55, n. 5, p. 219-222, 1990.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ANTHONY, B. R.; PHILLIPS, D. J.; BADR, S. et al. Decay control and quality maintenance after moist air heat treatment of individually plastic-wrapped nectarines. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.6, p.946-949, 1989.

ASIF, M. H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A simple procedure for isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 18, p. 109-115, 2000.

Associação Brasileira de Produtores de Maçã – ABPM. **Informações estatísticas da maçã**. Disponível em:  
[www.abpm.org.br/portugues/maca/estatisticas/informacoesestatisticas.html](http://www.abpm.org.br/portugues/maca/estatisticas/informacoesestatisticas.html)  
Acesso em: 20 de jun. 2004.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.

BARKAI-GOLAN, R.; PHILLIPS, D. J. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.11, p.1085-1089, 1991.

BENATO, E.; CIA, P.; SOUZA, N. L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. In: LUZ, W.; FERNÁNDEZ, J. M. ; PRESTES, A. M. et al. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, 2001, p.13-95.

BENITO, E. P.; PRINS, T.W.; VAN KAN, J.A.L. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant fungus interaction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 32, P. 947-957, 1996.

BIALE, J. B. Synthetic and degradative processes in fruit ripening. In: HAARD, N.; SALUNKHE, D. K. **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables**. Westport, Connecticut: AVI Publishing, 1975. p. 5-18.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: BONETI, J. I. S.; RIBEIRO, L. G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. p.13-95.

BONETI, J. I. S.; RIBEIRO, L. G.;KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 1999. p. 48-56.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Pathology and Plant Molecular Biology**, Oxon, v.43, p.83-116, 1992.

BROWN II, E. A.; BRITTON, K. O. Botryosphaeria diseases of apple and peach in the Southern United States. **Plant Disease**, St.Paul, n.70, p.480-484, 1986.

BRUTON, B. D. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.7, p. 747-749, 1994.

BURCHILL, R. T. Hot water as a possible postharvest control of *Gloeosporium* rots of stored apples. **Plant Pathology**, Oxford, v.13, n.3, p.106-107, 1964.

CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W. J.; KLEIN, J. D. et al. Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.4, p.700-704, 1999.

COUEY, H. M. Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p.198-202, 1989.

DE LA CRUZ, M.;RAMÍREZ, F.; HERNÁNDEZ, H. DNA isolation and amplification from cacti. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 15, p. 319-325, 1997.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Oxon, v.41, p.339-367, 1990.

EZEQUIEL, W. N. Modified procedure with the keitt single-spore method. **Phytopathology**, St.Paul, v. 20, p. 583-586, 1930.

FALLIK, E.; GRINBERG, M.; GAMBOURG, J. et al. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v.45, p.92-97, 1995.

FALLIK, E.; GRINBERG, S.; ALKALAI, S. et al. A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.15, p.25-32, 1999.

FALLIK, E.; KLEIN, J.; GRINBERG, S. et al. Effect of postharvest heat treatment of tomatoes on fruit ripening and decay caused by *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St.Paul, v. 77, n. 10, p. 985-988, 1993.

FALLIK, E.; TUVIA-ALKALAI, S.; FENG, X. et al. Ripening characterisation and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rising and brushing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 2, p. 127-132, 2001.

FERGUNSON, I. B.; BEN-YEHOSHUA, S.; MITCHAM, E. J. et al. Postharvest heat treatments: introduction and workshop summary. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, p. 1-6, 2000.

FULKERSON, J. F. *Botryosphaeria ribis* and its relation to a rot of apples. **Phytopathology**, St. Paul, v. 50, p. 394-398, 1960.

GALAU, G. A; LEGOCKI, A. B.; GREENWAY, S. C. et al. Cotton messenger RNA sequences exist in both polyadenylated and non-polyadenylated forms. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, p. 2551-2560, 1981.

HU, C. G.; HONDA, C.; KITA, M. et al. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 20, p. 69, 2002.

JACOBI, K. K.; WONG, L. S. The injuries and changes in ripening behaviour caused to Kensington mango by hot water treatments. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.291, p.372-378, 1991.

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

KARABULUT, O. A.; COHEN, L.; WIESS, B. et al. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, p. 103-111, 2002.

KAYS, S. J. **Postharvest Physiology of Perishable Plant Products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 532p. Cap. 3: Metabolic Processes in Harvested Products.

KEITT, G. W. Simple technique for isolating single-spore strains of certain types of fungi. **Phytopathology**, St.Paul, v. 5, p. 266-269, 1925.

KIM, K. W.; PARK, E. W.; AHN, K. Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. **Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 15, p. 223-227, 1999.

KIM, K. W.; PARK, E. W.; KIM, Y. H. et al. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 2, p. 165-172, 2001.

KLEIN, J.D.; LURIE, S. Prestorage heat treatment as a means of improving poststorage quality of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.2, p. 265-269, 1990.

KLEIN, J.D.; CONWAY, W.S.; WHITAKER, B.D. et al. *Botrytis cinerea* decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.122, n.1, p.91-94, 1997.

KOHN, F. C., Jr.; HENDRIX, F. F. Temperature, free moisture, and inoculum concentration effects on the incidence and development of white rot of apple. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 3, p. 313-316, 1982.

LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v.56, n.2, p.215-224, 1989.

LAMBERT, E. B. A spore isolator combining some of the advantages of the La Rue and Keitt methods. **Phytopathology**, St.Paul, v. 29, p. 212-214, 1939.

LEVERENTZ, B.; JANISIEWICZ, W. J.; CONWAY, W. S. et al. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 87-94, 2000.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; JANISIEWICZ, W. J. et al. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v. 27, p. 221-233, 2003.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967, 1992.

LOGERMAN, J.; SCHEEL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 163, p. 16-20, 1987.

LÓPEZ-GÓMEZ, R.; GÓMEZ-LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 440-442, 1992.

LUCAS, J. A. **Plant pathology and plant pathogens**. 3.ed. Oxford:The Blackwell Science, 1998. p.140-165.

LUNARDI, R.; SEIBERT, E.; PEZZI, E. et al. Tratamento por água quente na qualidade de maçãs Fuji' inoculadas artificialmente com *Botryosphaeria*

*dothidea*, em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.4, p. 565-570, 2002.

LUNARDI, R.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BENDER, R. J. Imersão em água quente no controle pós-colheita da podridão branca em maçãs 'Fuji'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 431-434, 2003.

LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops. **Horticultural Reviews**, Hoboken, NJ, v. 22, p. 91-121, 1998.

LURIE, S.; FALLIK, E.; KLEIN, J. D. et al. Postharvest heat treatment of apples to control San Jose Scale (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) and blue mold (*Penicillium expansum* Link) and maintain fruit firmness. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 1, p. 110-114, 1998.

LURIE, S.; SABEHAT, A. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. **Postharvest Biology Technology**, Amsterdam, v. 11, p. 57-62, 1997.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n.2, p.467-472, 1994.

MORGENS, P. H.; PYLE, J. B.; CALLAHAN, A. M. Searching for molecular mechanisms involved in fruit ripening. In: FOX, J. E.; JACOBS, M. **Molecular biology of plant growth control**. Univ. California, Los Angeles: University of California, 1987. v. 44, p. 157-166.

NOONBERG, S.; SCOTT, G. K.; BENZ, C. C. Effect of pH on RNA degradation during guanidinium extraction. **BioTechniques**, Westboro, v. 19, p. 731-733, 1995.

NYANJAGE, M.O.; WAINWRIGHT, H.; BISHOP, C.F.H. The effects of hot-water treatments in combination with cooling and/or storage on the physiology and disease of mango fruits (*Mangifera indica* Linn.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.73, n.5, p.589-597, 1998.

OBAGWU, J.; KORSTEN, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, p. 187-194, 2003.

PALOU, L.; USALL, J.; MUÑOZ, J. A et al. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, p. 93-96, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-453.

PAULL, R. E. Postharvest heat treatments and fruit ripening. **Postharvest News and Information**, Oxon, v. 1, n. 5, p. 355-363, 1990

PAVONCELLO, D.; LURIE, S.; DROBY, S. et al. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 17-22, 2001.

PHILLIPS, D.J.; AUSTIN, R.K. Changes in peaches after hot-water treatment. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, n.6, p.487-488, 1982.

PORAT, R.; PAVONCELLO, D.; PERETZ, J.; WEISS, B. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in Star Ruby grapefruit by a short hot water rinse and brushing treatment. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, UK, v. 75, p. 428-432, 2000.

PORRITT, S. W.; LIDSTER, P. D. The effect of pré-storage heating on ripening and senescence of apples during cold storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 103, p.584-587, 1978.

PRATELLA, C. Patologia post-raccolta degli ortofrutticoli: stato e sviluppo. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, n.1, p.69-72, 1997.

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

RHODES, M. J. C. The maturation and ripening of fruits. In: THIMANN, K. **Senescence in plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1980. p. 157-205.

ROY, S.; CONWAY, W.S.; WATADA, A.E. et al. Heat treatment affects epicuticular wax structure and postharvest calcium uptake in 'Golden Delicious' apples. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.9, p.1056-1058, 1994.

SÁNCHEZ-TORRES, P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Isolation and characterization of genes differentially expressed during the interaction between apple fruit and *Penicillium expansum*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 447-457, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.

SAMS, C.E.; CONWAY, W.S.; ABBOTT, J.A. et al. Firmness and decay of apples following postharvest pressure infiltration of calcium and heat treatment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.623-627, 1993.

SCHIRRA, M.; AGABBIO, M.; D'AQUINO, S. et al. Postharvest heat conditioning effects on early ripening 'Gialla' cactus pear fruit. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.4, p.702-704, 1997.

SCHIRRA, M.; D'HALLEWIN, G.; BEN-YEHOSHUA, S. et al. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, 21, p. 71-85, 2000.

SMILANICK, J. L.; MARGOSAN, D. A.; MLIKOTA, F. et al. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. **Plant Disease**, St.Paul, v. 83, p. 139-145, 1999.

SOMMER, N. F.; FORTLAGE, R. J.; BUCKLEY, P. M. et al. Radiation –heat synergism for inactivation of market disease fungi of stone fruits. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 57, p. 428-433, 1967.

SOMMER, N. F. Principles of disease suppression by handling practices. In: KADER, A. et al. **Postharvest technology of horticultural crops**. [S.l. : s.n.], 1985. 192 p. p. 75-82.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

SU, X.; GIBOR, A. A method for RNA isolation from marine macro-algae. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 174, p. 650-657, 1988.

SUTTON, T. B. Production and dispersal of ascospores and conidia of *Phylospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 71, p. 584-589, 1981.

SUTTON, T. B.; BOYNE, J. V. Inoculum availability and pathogenic variation in *Botryosphaeria dothidea* in apple production areas of North Carolina. **Plant Disease**, St.Paul, v. 67, n. 5, p. 503-506, 1983.

SUTTON, T. B. White rot. In: JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. (Eds) **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1990. p. 16-18.

SUTTON, T. B.; ARAUZ, L. F. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 11, p. 1146-1149, 1991.

TAYLOR, B.; POWEL, A. Isolation of plant DNA and RNA. **Focus**, [Vancouver], v. 4, p. 4-6, 1982.

THOMPSON, W. F.; EVERETT, N. O.; POLANS, R. A. et al. Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. **Planta**, Secaucus, NJ, n. 158, p. 487-500, 1983.

TRAVIS, J. W.; RUTTER, J. L.; BIGGS, A. R. White rot, *Botryosphaeria dothidea*. Disponível em: [www.caf.wvu.edu/Kearneysville/disease-descriptions/omwhiter.html](http://www.caf.wvu.edu/Kearneysville/disease-descriptions/omwhiter.html) . Acesso em: 30 de novembro de 2003.

VALDERRAMA-CHÁIREZ, M. L.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation of functional RNA from cactus fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 20, p. 279-286, 2002.

VERWOERD, T. C.; DEKKER, B. M. M.; HOEKEMA, A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 2362, 1989.

WILLS, R. H.; LEE, T. H.; GRAHAM, D. et al. **Postharvest**: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. London: Granada, 1981. 162 p.

WILSON, C. L.; EL-GHAOUTH, A.; CHALUTZ, E. et al. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant Disease**, St.Paul, v. 78, n. 9, p. 837-844, 1994

ZENG, Y. ; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Ottawa, v. 20, p. 417, 2002.

## **7. VITA**

Andréia Hansen Oster, filha de Leopoldo Oster e Imgrat Hansen. Nasceu em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul em 11 de março de 1968.

Cursou o primeiro e segundo grau no Colégio Santa Rosa de Lima, em Lages, Santa Catarina. Em 1986 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages, onde se graduou como Engenheira Agrônoma em setembro de 1991.

Foi professora no Colégio Agrícola de Iomerê, em Videira, Santa Catarina entre fevereiro e dezembro de 1992. Em 1993 ingressou no Curso de Mestrado em Agronomia do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, Rio Grande do Sul, onde obteve o grau de Mestre em Agronomia em dezembro de 1995.

Foi professora colaboradora no Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina entre agosto de 1994 e julho de 1998, atuando na área de Fisiologia Vegetal. A partir de 1998 ingressou como professora no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade do Planalto Catarinense em Lages, Santa Catarina, atuando na área de Fisiologia Vegetal.

Em março de 2000 ingressou no Curso de Doutorado em Fitotecnia, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.