

BRUNO PANSERA ESPÍNDOLA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E VAPORIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM PÊSSEGOS 'CHIMARRITA'**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Cristiano André Steffens

**LAGES, SC
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Pansera-Espíndola, Bruno
Indução de resistência e vaporização de óleos
essenciais no controle de podridões pós-colheita em
pêssegos 'Chimarrita' / Bruno Pansera-Espíndola. -
Lages , 2017.
83 p.

Orientador: Cristiano André Steffens
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2017.

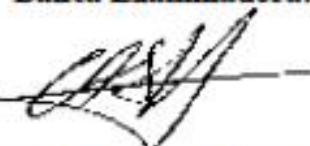
1. *Prunus persica*. 2. Metabolismo secundário. 3.
Elicitores. 4. S-metil
benzo[1,2,3]tiadiazole-7-carbotioico. 5. Controle
alternativo. I. Steffens, Cristiano André. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

BRUNO PANSERA ESPÍNDOLA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E VAPORIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAS NO
CONTROLE DE PODRIDÕES PÓS-COLHEITA EM PÊSSEGOS 'CHIMARRITA'**

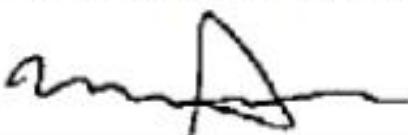
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Banca Examinadora:



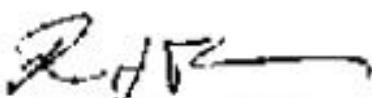
Orientador:

Professor Dr. Cristiano André Steffens
Universidade do Estado de Santa Catarina



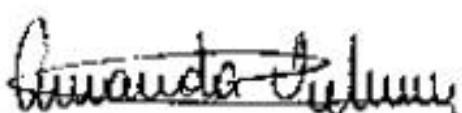
Membro:

Professor Ph.D. Cassandro Vidal Talamini do Amarante
Universidade do Estado de Santa Catarina



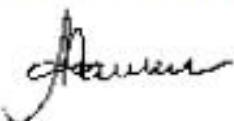
Membro:

Professor Dr. Ricardo Trezzi Casa
Universidade do Estado de Santa Catarina



Membro:

Professora Dra. Amanda M F Drehmer Vieira
Instituto Federal Catarinense – Campus de Videira (IFC)



Membro:

Dra. Andréia Hansen Oster
Embrapa Agroindústria Tropical

Aos meus avós, pais e futura mulher, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Sagrado pelo amparo espiritual infinito, incondicional e sempre certo.

Aos meus avós Sady Pansera e Alúria Sawiak Pansera, que são o cerne da árvore da nossa família aqui na terra e aos avós Milton Espíndola e Vilsa Nunes Espíndola, que já partiram, mas que sempre estarão presentes.

Especialmente à minha mãe amada exemplo de força e de amor perpétuo, incondicional, irrestrito e absoluto que sempre encarou as experiências difíceis com vontade e fé inabaláveis como mãe provedora que sempre foi desde os primeiros momentos vividos no ventre.

Ao meu pai, chefe de família exemplar, do qual tenho extremo orgulho e que tento me espelhar ao máximo, que passou para mim e para minha amada irmã valores como simplicidade, amor, fidelidade e honestidade.

Aos familiares queridos que estão nesse mundo, aos que partiram a tempos e aos que se foram recentemente, em especial ao meu amado primo/irmão Arthur Pansera Demétrio que sempre foi proativo e com tamanha vontade de ajudar quem lhe solicitava e que agora nos transmite luz, expresso imensurável gratidão a todos, pois nenhuma conquista da vida se consegue sem esse amparo e reconhecer essa importância é fundamental para seguir em frente com humildade e respeito nunca esquecendo das origens nem dos destinos visados.

À minha futura mulher, muito obrigado pelo carinho, paciência e amor. Sem dúvida, essa etapa foi um grande desafio para nós e com toda certeza não será o último. Desculpe-me pelos momentos de ausência, em que o tempo de dedicação ao nosso relacionamento foi pequeno. Obrigado por sempre me compreender e apoiar. Sem esquecer do auxílio na execução das análises e no fornecimento de alimentação nas madrugadas passadas no laboratório. Aos meus sogros que fizeram de sua casa a minha e aos demais integrantes da família Beppler.

Aos meus orientadores Cristiano e Cassandro, aos professores da graduação, do mestrado e do doutorado, obrigado pelos conhecimentos passados e pelos que juntos foram gerados.

Aos produtores rurais, que cederam espaço em suas propriedades, maquinário quando preciso e frutos.

Ao prof. Dr. Ricardo por ceder espaço e equipamentos do laboratório de Fitopatologia da UDESC/CAV, orientar em questões práticas e por ter fortemente colaborado na ocasião da qualificação.

A Embrapa Agroindústria Tropical, na pessoa da Dra. Andréia Hansen, pela parceria firmada que colaborou muito para a elaboração dessa obra.

Ao Prof. Dr. Sérgio, que abriu as portas de sua instituição UTFPR, cedendo o trabalho de bolsistas, reagentes equipamentos e sobretudo conhecimento adquirido ao longo de sua admirável carreira, que muito contribuiu para se alcançar os resultados contidos nessa tese.

Aos colegas bolsistas, pós-graduandos, aos amigos feitos nessa trajetória.

Aos servidores e docentes do IFSC, onde ingressei no funcionalismo público federal, que me apoiaram e foram flexíveis em diversas situações para conciliar a profissão de docente com a execução do doutorado.

Aos servidores, docentes e amigos do IFC, minha atual instituição, onde com orgulho e satisfação desempenho minha vocação de docente, a eles que manejaram horários e disponibilizaram recursos e que mantém um excelente ambiente de trabalho agradeço.

RESUMO

PANSERA-ESPÍNDOLA, Bruno, **Indução de resistência e vaporização de óleos essenciais no controle de podridões pós-colheita em pêssegos 'Chimarrita'**. 2017. 83 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Biologia e Tecnologia Pós-Colheita) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2017.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação pré-colheita de produtos indutores de resistência sobre a indução de resistência, incidência e severidade de podridão-parda e de podridão-mole e sobre os atributos de qualidade de pêssego ‘Chimarrita’. Bem como, avaliar o efeito do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) aplicado via fumigação, nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, sobre o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* dos agentes causais da podridão-parda e podridão-mole em pêssegos ‘Chimarrita’, bem como sobre a qualidade dos frutos após o armazenamento. O experimento com indutores de resistência foi conduzido em duas safras. As pulverizações com água (controle), acibenzolar-S-metil (ASM; 30 e 60 mg de ingrediente ativo (i.a.) L^{-1}), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (1 e 2 mL de produto comercial (p.c.) L^{-1}), *Bacillus subtilis* (10 mL de p.c. L^{-1}) e quitosana (10 g de i.a. L^{-1}) foram realizadas com intervalo de uma semana totalizando quatro pulverizações, sendo a última aplicada uma semana antes da colheita. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo (0,05% v/v). Os frutos foram colhidos e separados em quatro lotes: sem inoculação (inoculação natural) e inoculação de *M. fructicola* com ferimento, *M. fructicola* sem ferimento e *R. stolonifer* com ferimento. A inoculação foi realizada no dia da colheita e após os frutos foram armazenados por 30 dias sob refrigeração ($0\pm1^\circ\text{C}$, UR $95\pm2\%$) seguidos por mais quatro dias sob $20\pm2^\circ\text{C}$, UR $60\pm5\%$. O experimento *in vitro*, consistiu na aplicação dos mesmos tratamentos vertidos junto ao meio BDA e posteriormente inoculados com um disco de 5 mm retirados da extremidade de crescimento das colônias puras dos dois patógenos. Para fumigar o óleo nos frutos utilizou-se um recipiente plástico selado com um filme PVC, o período de armazenamento foi o mesmo que o utilizado no experimento de indução de resistência. No experimento *in vitro* os óleos foram fumigados dentro das placas de Petri com meio BDA inoculadas com os discos com o fungo. Os indutores de resistência desencadearam o mecanismo de defesa dos frutos, apresentando maior atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e quitinase, retendo o desenvolvimento das doenças. Não houve efeito sobre a qualidade dos frutos nem sobre a atividade metabólica. Os tratamentos ASM (30 mg L^{-1}) e *S. cerevisiae* (1 mL L^{-1} sem e com NaOH) não reduziram o crescimento micelial de *M. fructicola* *in vitro*. Não houve redução do crescimento micelial *in vitro* de *R. stolonifer* com tratamentos à base de ASM, porém os demais tratamentos apresentaram efeito redutor de crescimento deste fungo. A aplicação do óleo essencial de citronela, tangerina e eucalipto reduziu o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de *M. fructicola* e de *R. stolonifer*. A dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ causou fitotoxidez nos frutos, aumentando a taxa de produção de etileno. Os indutores ASM (60 mg L^{-1}), *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana reduziram o desenvolvimento das doenças sem alterar os atributos de qualidade, apresentando potencial para o manejo das doenças podridão-parda e podridão-mole na cultura do pessegueiro ‘Chimarrita’.

Palavras-chave: *Prunus persica*. Metabolismo secundário. Elicitores. S-metil benzo[1,2,3]tiadiazole-7-carbotioico. Controle alternativo.

ABSTRACT

PANSERA-ESPÍNDOLA, Bruno, **Induction of resistance and vaporization of essential oils in the control of postharvest rot in 'Chimarrita' peaches**. 2017. 83 f. Thesis (Doctorate in Plant Science – Area: Postharvest Biology and Technology) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Graduation Program in Plant Sciences, Lages, 2017.

The objective of this work was to evaluate the effect of the pre-harvest application of resistance-inducing products on the induction of resistance, incidence and severity of brown rot and soft rot and on the quality attributes of 'Chimarrita' peach and evaluate the effect of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*), mandarin (*Citrus reticulata*) and eucalyptus (*Corymbia citriodora*) applied at the doses of 0, 50, 100, 500 and 1,000 $\mu\text{L L}^{-1}$ on the *in vitro* and *in vivo* development of casual agents of brown rot and soft rot on 'Chimarrita' peaches, as well as on fruit quality after storage. The experiment with inductors of preharvest resistance was conducted in two harvests. The sprays with water (control), acibenzolar-S-methyl (ASM, 30 and 60 mg of active ingredient (a.i.) L^{-1}), phosphorylated mannanoligosaccharide of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall (1 and 2 mL of commercial product (c.p.) L^{-1}), *Bacillus subtilis* 10 mL of c.p. L^{-1}) and chitosan (10 g of a.i. L^{-1}) were performed at one week interval, totaling four sprays, the last one being applied one week before harvest. Adhesive sparerant (0.05% v / v) was added in all treatments. The fruits were harvested and separated in four batches: without inoculation (natural inoculation) and inoculation of *M. fructicola* with wound, *M. fructicola* without injury and *R. stolonifer* with wound. The inoculation was performed on the day of harvest and after the fruits were stored for 30 days under refrigeration ($0 \pm 1^\circ\text{C}$, RH $95 \pm 2\%$) followed by four days at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, RH $60 \pm 5\%$. The *in vitro* experiment consisted in the application of the same treatments poured into the BDA medium and later inoculated with a 5 mm disc removed from pure colonies of the two pathogens. To vaporize the oil on the fruits was used a plastic container sealed with a PVC film, the storage period was the same as that used in the resistance induction experiment. In the *in vitro* experiment the oils were fumigated into the Petri dishes with BDA medium inoculated with the fungi. The inducers triggered the fruit defense mechanism, showing a greater activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and chitinase, retaining the development of the diseases. There was no effect on fruit quality or on metabolic activity. The ASM (30 mg L^{-1}) and *S. cerevisiae* (1 mL L^{-1} without and with NaOH) treatments did not reduce mycelial growth of *M. fructicola* in vitro. For the pathogen *R. stolonifer* the reduction of mycelial growth in vitro did not occur with treatments based on ASM. The application of citronella, mandarin and eucalyptus essential oil reduced the *in vitro* and *in vivo* development of brown rot and soft rot. The dose of 1,000 $\mu\text{L L}^{-1}$ caused phytotoxicity, increasing the rate of ethylene production. The inducers ASM (60 mg L^{-1}), *S. cerevisiae*, *B. subtilis* and chitosan reduced the development of diseases without altering the quality attributes, and could be another tool in the control of brown rot and soft rot diseases in culture of the 'Chimarrita' peach.

Keywords: *Prunus persica*. Secondary metabolism. Elicitors. S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic. Alternative control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Área abaixo da curva de progresso da doença da incidência (AACPDi) e da severidade (AACPDs) de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em frutos de pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem ($0\pm0,2$ °C/UR de $95\pm2\%$) na presença de óleo essencial de citronela nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).....53
- Figura 2 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPF de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação a 25 °C com o óleo essencial de citronela fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, para os dois patógenos, e nas doses de 0, 1, 2, 3, 4 e 8 $\mu\text{L L}^{-1}$, somente para *M. fructicola* submetidos à análise de regressão.....55
- Figura 3 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência e da severidade de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem (0 ± 1 °C) na presença de óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, e por mais 4 dias à 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$60
- Figura 4 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPD da severidade de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação à 25 °C com o óleo essencial de tangerina fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, para os dois patógenos e nas doses de 0, 1, 2, 4 e 8 %, somente para *R. stolonifer*, submetidos à análise de regressão.....61
- Figura 5 – Área abaixo da curva de progresso da doença da incidência e da severidade de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem ($0\pm0,2$ °C/UR de $95\pm2\%$) na presença de óleo

essencial de eucalipto nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).....66

Figura 6 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPD da severidade de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação a 25 °C com o óleo essencial de eucalipto fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, submetidos à análise de regressão.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a incidência de <i>Monilinia fructicola</i> e de <i>Rhizopus stolonifer</i> com inoculação natural, em pêssegos ‘Chimarrita’ tratados com elicidores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C/UR $95\pm2\%$) mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, nas safras de 2013 e 2016.....	33
Tabela 2. – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a severidade e incidência de <i>Monilinia fructicola</i> inoculado sem e com ferimento e de <i>Rhizopus stolonifer</i> inoculado com ferimento, em pêssegos ‘Chimarrita’, inoculados no dia da colheita, tratados com elicidores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C, UR $95\pm2\%$) mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, na safra 2013.	34
Tabela 3 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a severidade e incidência de <i>Monilinia fructicola</i> inoculado sem ferimento e de <i>Rhizopus stolonifer</i> inoculado com ferimento, em pêssegos ‘Chimarrita’, inoculados no dia da colheita, tratados com elicidores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C, UR $95\pm2\%$) mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, na safra 2016.	35
Tabela 4 – Área abaixo da curva de progresso do fungo (AACPF), com base no crescimento micelial <i>in vitro</i> , de <i>Monilinia fructicola</i> e de <i>Rhizopus stolonifer</i> , com os elicidores vertidos junto ao meio BDA, incubados por sete dias para <i>M. fructicola</i> e por 3 dias para <i>R. stolonifer</i> em câmara BOD 25 ± 1 °C, foto período de 12 horas.....	36
Tabela 5 – Teores de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase (PO), da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, teor de açúcares totais e de açúcares redutores em pêssegos ‘Chimarrita’, armazenados por 30 dias a $0\pm0,2$ °C, UR $95\pm2\%$, na saída da câmara e após 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, safra 2013.....	38

Tabela 6 – Coeficientes de correlação entre os atributos bioquímicos de teores de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase (PO), da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, e a área abaixo da curva de progresso da doença em severidade e em incidência de <i>Monilinia fructicola</i> inoculado sem e com ferimento e de <i>Rhizopus stolonifer</i> inoculado com ferimento em pêssegos ‘Chimarrita’, armazenados por 30 dias a 0±1 °C, UR 95±2%, na saída da câmara e após 4 dias a 20±2 °C, UR 60±5%, safra 2013.....	39
Tabela 7 – Firmeza de polpa (N), acidez (meq 100 ml ⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), cor da epiderme (h°), respiração (mL CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹) e produção de etileno (μL C ₂ H ₄ kg ⁻¹ h ⁻¹) em pêssegos ‘Chimarrita’, não inoculados, submetidos a tratamento pré-colheita com indutores, após 30 dias de armazenamento (0±1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%), safra 2013.....	39
Tabela 8 – Firmeza de polpa (N), acidez (meq 100 ml ⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), cor da epiderme (h°) em pêssegos ‘Chimarrita’, não inoculados, submetidos a tratamento pré-colheita com indutores, após 30 dias de armazenamento (0±1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%), safra 2016.....	40
Tabela 9 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>), determinados por de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.....	52
Tabela 10 – Produção (nº de esporos cm ⁻²) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos ‘Chimarrita’ inoculados com <i>Monilinia fructicola</i> e <i>Rhizopus stolonifer</i> e submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 μL L ⁻¹ por 30 dias de armazenamento refrigerado (0±0,2 °C/UR de 95±2%), seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).....	54
Tabela 11 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI ₅₀), <i>in vitro</i> , equações de regressão e coeficiente de determinação (R ²) do óleo essencial de citronela para a porcentagem de controle do crescimento micelial de <i>Monilinia fructicola</i> ,	

determinados nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, e 8 $\mu\text{L L}^{-1}$, e de *Rhizopus stolonifer* nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$55

Tabela 12 – Produção (10^6 mL^{-1}) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, incubadas à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ 56

Tabela 13 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL^{-1}), sólidos solúveis (°Brix), ângulo hue, taxa respiratória ($\text{mL CO}_2 \text{kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e de produção de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigação de óleos essenciais citronela (*Cymbopogon nardus*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ durante 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C/UR de $95\pm2\%$), seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).....58

Tabela 14 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*), determinados por de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.....59

Tabela 15 – Produção (n° de esporos cm^{-2}) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos 'Chimarrita' inoculados com *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer*, submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, após 30 dias de armazenamento (0 ± 1 °C/UR de $95\pm2\%$) mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).....61

Tabela 16 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), *in vitro*, equações de regressão e coeficiente de determinação (R^2) do óleo essencial de tangerina para porcentagem de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, determinados nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, e de *Rhizopus stolonifer* nas concentrações de 0, 1, 2, 4 e 8 %.....62

Tabela 17 – Produção (10^6 mL $^{-1}$) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, incubadas à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$63

Tabela 18 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL $^{-1}$), sólidos solúveis (°Brix), ângulo hue, respiração (mL CO₂ kg $^{-1}$ h $^{-1}$) e produção de etileno (µL C₂H₄ kg $^{-1}$ h $^{-1}$) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigação de óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$, após 30 dias de armazenamento (0±0,2 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).....64

Tabela 19 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*), determinados por de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.....65

Tabela 20 – Produção (nº de esporos cm $^{-2}$) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos 'Chimarrita' inoculados com *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer*, submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$, após 30 dias de armazenamento (0±0,2 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).....67

Tabela 21 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), *in vitro*, equações de regressão e coeficiente de determinação (R²) do óleo essencial de eucalipto para porcentagem de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, determinados nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$69

Tabela 22 – Produção (10^6 mL $^{-1}$) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*,

respectivamente, incubados à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹69

Tabela 23 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), ângulo *hue*, respiração (mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) e produção de etileno (µL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigação de óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, após 30 dias de armazenamento (0±1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).....69

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorção
AACPD	área abaixo da curva de progresso da doença
AACPDs	área abaixo da curva de progresso da doença com base na severidade
AACPDsoe	área abaixo da curva de progresso da doença, severidade, dos tratamentos com diferentes doses dos óleos essenciais
AACPDsc	área abaixo da curva de progresso da doença com base na severidade do tratamento controle
AACPDst	área abaixo da curva de progresso da doença com base na severidade do tratamento com indutores
ASM	acibenzolar-S-metil
AT	acidez titulável
α	nível de significância
BABA	ácido β -aminobutírico
BDA	batata dextrose ágar
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
<i>Bs</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
°Brix	graus Brix
C	cromaticidade
°C	graus Celsius
Cf	concentração de óleo essencial fumigada
CI ₅₀	concentração inibitória de 50%
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
C _{oe}	concentração do óleo essencial
C.V.	coeficiente de variação
C ₂ H ₄	Etileno
Cu	Cobre
D _{mf}	densidade média do pêssego ‘Chimarrita’

DNS	dinitrosalicilato
DTT	ditiotreitol
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EDTA	etilenodiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos da América
FAL	fenilalanina amônia-liase
FID	detector de ionização de chama
FP	firmeza de polpa
g	gramas
g	aceleração da gravidade terrestre
h	hora
h°	ângulo <i>hue</i>
ha	hectare
HP	Hewlett-Packard
H_2	hidrogênio
Ii	incidência em porcentagem
i.a.	ingrediente ativo
IK	índice Kovats
INA	ácido 2,6 dicloro isonicotínico
kg	quilograma
L	litro
L	luminosidade
m	metro
M	molar
meq	miliequivalente
mM	milimolar
mg	miligrama
min	minuto
M_f	massa dos frutos
<i>Mf</i>	<i>Monilinia fructicola</i>
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanometro

N	Newton
N	normal
NaOH	hidróxido de sódio
Ni	número de frutos/inoculações com lesões dos patógenos
nmol	nanomol
ns	não significativo
Nt	número total de frutos/inoculações
p	probabilidade
PC	percentual de controle da lesão
pH	potencial de hidrogênio
PO	peroxidase
PR	proteína relacionada à patogênese
PVP	polivinilpirrolidona insolúvel
p.c.	produto comercial
Qt	quitosana
R ²	coeficiente de determinação
RLA	resistência local adquirida
RS	Rio Grande do Sul
<i>Rs</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
RSA	resistência sistêmica adquirida
RSI	resistência sistêmica induzida
s	segundo
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SC	Santa Catarina
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SS	sólidos solúveis
Si	severidade da doença, diâmetro médio da lesão iésima observação
S _{i+1}	severidade da doença, diâmetro médio da lesão na avaliação i + 1
sp	espécie
T _i	tempo em dias da iésima observação
T _{i+1}	dias da avaliação i + 1

TMV	<i>tomato mosaic virus</i>
TRIS-HCl	tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico
U	unidade
UR	umidade relativa
v/v	volume por volume
V _f	volume dos frutos
V _{oe}	volume calculado de óleo essencial
V _l	volume livre
WG	granulado dispersível
®	marca registrada
µL	microlitro
µm	micrometro
±	mais ou menos
%	porcentagem
<	menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE PODRIDÃO-PARDA E PODRIDÃO-MOLE EM PÊSSEGOS ‘CHIMARRITA’ ARMAZENADOS.....	25
2.1 RESUMO.....	25
2.2 INTRODUÇÃO.....	25
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.4 RESULTADOS	33
2.5 DISCUSSÃO.....	40
2.6 CONCLUSÕES.....	43
3 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon nardus</i>, <i>Citrus reticulata</i> E <i>Corymbia citriodora</i> COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PODRIDÕES EM PÊSSEGOS ‘CHIMARRITA’.....	45
3.1 RESUMO.....	45
3.2 INTRODUÇÃO.....	45
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.4.1 Óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	51
3.4.2 Óleo essencial de tangerina (<i>Citrus reticulata</i>).....	58
3.4.3 Óleo essencial de eucalipto (<i>Corymbia citriodora</i>).....	64
3.5 CONCLUSÕES.....	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1 INTRODUÇÃO GERAL

O fitopatógeno *Monillinia fructicola* (Wint.) Honey, causador da podridão-parda, é o responsável pelo maior prejuízo econômico na cultura do pessegueiro e essa perda está mais associada à podridão na pós-colheita dos frutos. O fungo infecta inicialmente os órgãos florais e a partir da flor pode colonizar o pedúnculo penetrando no ramo causando cancros e posterior anelamento dos ramos acarretando na murcha e morte das partes terminais dos ramos (MAY-DE MIO et al., 2008). Nas condições climáticas da região sul do Brasil, o inóculo primário consistiria na liberação de conídios que permanecem, de uma safra para outra, em frutos mumificados, presentes no solo ou fixos às plantas (AGRIOS, 2004). Outra fase de alta suscetibilidade, além da floração, seria a pré-colheita onde o sintoma da infecção aparece na forma de pequenas lesões pardacentas evoluindo para manchas de coloração marrom com o aumentar dos tecidos infectados pelo patógeno (MAY DE MIO et al., 2004). Frutos com podridão-parda apresentam estruturas de frutificação com a coloração parda durante o período de maturação, facilmente visualizadas a campo, começando então a desidratação que antecede a mumificação dos frutos.

A podridão-mole causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. é uma importante doença que afeta ameixeiras, nectarineiras e pessegueiros e apesar de estar mais associada à pós-colheita pode ocorrer quando os frutos ainda estão na planta. A podridão inicia-se quando há o contato do esporo com a superfície lesionada do fruto, sendo essa a única via de infecção, com a secreção de enzimas pectolíticas pelo fungo ocorre a quebra e dissolução de substâncias pécticas da lamela média comprometendo a integridade dos tecidos vegetais (AGRIOS, 2004). Com isso há a perda de coesão entre as células e o consequente desenvolvimento da podridão-mole. A podridão de aspecto aquoso se instaura rapidamente após a colonização e desenvolvendo esporângios e a produção de esporos se dá de forma intensa. A temperatura ideal de desenvolvimento seria por volta de 15 – 23°C e o tratamento químico recomendado para seu controle seria a aplicação pós-colheita de iprodiona ou dicloran (KIMATI et al., 2005).

De maneira geral, para se minimizarem as perdas pós-colheitas por podridões, poderiam ser citados um conjunto de ações que começariam com o cuidado a campo até a mesa do consumidor. A sanidade do pomar e a colheita seriam pontos chave para o incremento do potencial de armazenamento. A colheita deve ser efetuada em época recomendada e com cuidado para não causar dano mecânico, que além de depreciarem o

valor comercial dos frutos, é um mecanismo de infecção para diversos patógenos causadores de podridões em pós-colheita.

O método de controle ideal para a podridão-parda e a podridão-mole seria o emprego de cultivar resistente, no entanto, apesar de se ter observado o desenvolvimento da podridão-parda mais lento em algumas cultivares, não se tem, até o presente momento, registro de cultivares resistentes a *M. fructicola* e a *R. stolonifer*. Sendo assim a base do controle das doenças em questão, atualmente, é o controle químico, com base em calendário fixo, onde se concentram as aplicações nas fases de maior suscetibilidade da cultura ao patógeno, no caso da podridão-parda: floração e pré-colheita (MAY-DE-MIO et al., 2008). Então, para se obter a recomendada sanidade do pomar, os fungicidas mais utilizados ao longo do tempo em pré-colheita na região sul foram o tiofanato metílico, vinclozolin, iprodione, mancozeb, captan, diodine, enxofre e cúpricos (KIMATI et al., 2005).

No entanto, com a produção integrada de frutas adotada no sul do Brasil, tende-se a restringir o uso de agrotóxicos tanto em pré quanto em pós-colheita e a adotar o monitoramento para a decisão de intervenção química no pomar em substituição da adoção de calendário fixo (KOVALESKI et al., 2003). A produção integrada de frutas e sistemas de produção de alimentos com segurança ambiental vêm ao encontro do anseio da sociedade, que cada vez mais se conscientiza e busca fontes de alimentos que tenham sido produzidos com a minimização da agressão ao ambiente e do risco à saúde dos trabalhadores rurais. Segundo Santos et al. (2004) o cuidado por parte dos consumidores em adquirir alimentos saudáveis e seguros está em crescimento e o uso de fungicidas, visto que são produtos com riscos ambientais e toxicológicos, contrasta com essa preocupação. O uso de elicitores de resistência seria uma alternativa ao controle químico de podridões pós-colheita com fungicidas

Os vegetais superiores apresentam resistência natural a patógenos que dependem de diversos fatores pré-existentes ou que serão posteriormente formados após o contato com o patógeno (AGRIOS, 2004). Os fatores pós-formados têm sua produção ou ativação aumentada em resposta à presença do patógeno e, quando de natureza bioquímica, são geralmente moléculas repelentes e/ou tóxicas aos patógenos ou causam uma situação adversa para o estabelecimento do patógeno no tecido vegetal (AGRIOS, 2004).

Apesar de ser considerada como recente no meio científico os primeiros relatos de indução de resistência tiveram início por volta da primeira metade do século passado. Segundo Chester (1933) plantas suscetíveis tornaram-se resistentes, ou seja, adquiriram resistência a doenças, após terem sido tratadas com formas atenuadas de patógenos ou sofrerem uma infecção primária. Posteriormente, Cruickshank e Mandryk (1960),

evidenciaram o caráter sistêmico da resistência induzida, trabalhando com fumo, onde observaram que plantas com podridão caulinar causada por *Peronospora hyoscyami* de Bary f. sp. *tabacina*, apresentaram aumento de resistência contra doenças foliares.

A partir desses trabalhos pioneiros, que inicialmente não tiveram seu valor reconhecido, mas sim ignorados (KUC, 2001), diversos outros foram produzidos e atualmente são pesquisados em grande número nas mais variadas espécies vegetais por todo o globo terrestre (BOSTOCK, 1999; REUVENI et al., 2000; BOSTOCK et al., 2001; VISWANATHAN; SAMIYAPPA, 2002; BERTINI et al., 2003; BUZI et al., 2004, TERRY; JOYCE 2004; BOSTOCK 2005; PROFOTOVÁ et al., 2006; SILVA et al., 2007; DANNER et al., 2008; TAVARES et al., 2009; ALIZADEH et al., 2013; LUZZATTO-KNAAN et al., 2013; NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013; SON et al., 2014).

Moléculas, de natureza biótica ou abiótica tanto orgânica quanto inorgânica, podem ativar a defesa natural da planta atuando como indutor de resistência. Essas moléculas responsáveis por induzirem a resistência são conhecidas como elicidores ou eliciadores. Os elicidores podem desencadear três tipos conhecidos de resistência: resistência local adquirida (RLA), a resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (RSA). Apesar de as respostas fenológicas das diferentes formas de resistência serem, em certa parte, semelhantes, estas diferem principalmente em relação a parte do vegetal onde atua a resistência e a rota metabólica dos compostos chave envolvidos no processo de resistência (TERRY; JOYCE, 2004).

A RSA ocorre com a ativação de genes da rota de síntese do ácido salicílico, que, após o incremento da sua produção, age como um sinalizador para a síntese de proteínas associadas à patogênese conhecidas como proteínas PR (TERRY; JOYCE, 2004). O mecanismo de RSI não depende do ácido salicílico, atuando outros genes que serão responsáveis pelo aumento da produção de jasmonato e etileno, sendo esses os compostos chave que regulam o processo de RSI (TERRY; JOYCE, 2004; BONALDO et al., 2005). Os principais elicidores da RSI seriam as rizobactérias, bactérias não-patogênicas, consideradas bactérias promotoras de crescimento. Os indutores de RSA podem ser o ácido salicílico ou seus análogos, sendo um dos mais estudados o éster S-metílico do ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotióico conhecido popularmente como acibenzolar-S-metil (ASM) ou bióticos (patógenos atenuados ou organismos não patogênicos) resultando na resistência de vários tecidos das plantas a diversos patógenos como vírus, bactérias e fungos (BONALDO et al., 2005). Um dos mecanismos de resposta envolvidos na RSA seria a hipersensibilidade, considerada por alguns como o ápice da resistência, pois impede o

desenvolvimento de agentes causais biotróficos devido à morte celular controlada no sítio de infecção do patógeno, estando associada à produção de espécies reativas de oxigênio com alta capacidade oxidante como o peróxido de hidrogênio (SCHENK et al., 2000). Seriam também respostas da RSA a ativação de algumas enzimas, como a fenilalanina amônia-liase e a produção e acúmulo, de fenilpropanóides, fitoalexinas, compostos fenólicos, peroxidases, quitinases, β -1,3-glucanases e de outras proteínas RP (STICHER et al., 1997; CAVALCANTI et al., 2005). Os mecanismos de resposta RSA também podem ser de caráter estrutural como o caso do aumento de deposição de lignina nos tecidos vegetais (CAVALCANTI et al., 2005).

O tempo compreendido entre o contato com o elicitor e a indução da RSA não é constante entre as espécies vegetais nem entre elicidores. Há relatos de apenas poucas horas, como o caso do pepino inoculado com *Pseudomonas syringae* que levou somente 7 horas para a indução da RSA, em contrapartida outros patossistemas como o caso do tabaco, pode chegar a 3 semanas após a infecção primária com *Perenospora parasitica* pv *tabaci* (STICHER et al., 1997). Outra questão temporal relevante seria a duração da RSA, uma vez induzida, que dependendo de diversos fatores pode durar por 10 semanas no caso da resistência de pepino a *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst. inoculado sistematicamente com uma raça avirulenta do mesmo patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Tempos diferentes de permanência são observados entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Enquanto uma única aplicação de ASM é, de maneira geral, suficiente para manter a RSA por todo o ciclo do trigo, culturas de monocotiledôneas necessitam de sequenciais aplicações para manter a RSA ao longo do tempo à campo (GÖRLACH et al., 1996; MORRIS et al., 1998 LOUWS et al., 2001; ROMERO et al., 2001).

Como citado anteriormente, são diversos os compostos que possuem a capacidade de induzir resistência de plantas contra patógenos, podendo ser biótico ou abiótico. Pode-se citar alguns exemplos de trabalhos com indutores como o ácido 2,6-dicloro isonicotínico (INA) em feijão (DANN, et al., 1996) e em beterraba (Nielsen et al., 1994), acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido β -aminobutírico (BABA) em ervilha (BARILLI et al., 2012), proteína harpina em citros (MOSCOSO-RAMÍREZ; PALOU, 2013), quitosana em feijoeiro (DI PIERO; GARDA, 2008), *Saccharomyces cerevisiae* em eucalipto (BOAVA et al., 2010), metil jasmonato em tangerina (GUO, et al., 2014) e *Bacillus subtilis* em mirtilo (NGUGI et al., 2005). Há propriedades que permitem afirmar que realmente ocorreu um processo de indução de resistência na planta por determinados elicidores. Algumas destas propriedades são: a não atuação direta do elicitor sobre o patógeno, o indutor não produz compostos

secundários com efeito anti-microbiano, e, umas das suas fundamentais características, a sensibilização dos mecanismos de defesa da planta à presença de patógenos (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

No entanto, óleos e extratos vegetais podem apresentar tanto o efeito elicitor, desenvolvendo de fato a indução de resistência, quanto a da ação direta no patógeno por possuir atributos antimicrobianos, fungistáticos e fungitóxicos (BONALDO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; ASGHARI et al., 2009). Essas características inerentes dos óleos e extratos vegetais os tornam promissores na utilização tanto na indução de resistência quanto no controle de podridões em pós-colheita. Outro fator que desperta interesse seria a possibilidade de o próprio agricultor produzir seu insumo reduzindo os custos e, colaborando também, para se alcançar a sustentabilidade na produção agrícola. Por essas características há uma crescente produção de trabalhos científicos que visam estudar a propriedade biocida de metabólitos secundários produzidos por vegetais e extraídos na forma de extratos e óleos (MARI et al., 2003). Asghari et al. (2009) observaram efeito fungitóxico de óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum*), bem como, o aumento da vida de prateleira devido a redução de podridão causada por *Botrytis cinerea* em morango. Resultados semelhantes foram encontrados por Bonaldo et al. (2004) que ao testar o extrato aquoso de eucalipto nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25%, encontraram redução na germinação de esporos de *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ells & Halst. Mohammadi e Aminifard (2012), ao trabalharem com óleos essenciais de *Carum copticum*, *Pimpinella anisum*, *Ziziphora clinopodioides* e *Cinnamomum zeylanicum* na concentrações de 0, 200, 400, 600 e 800 $\mu\text{L L}^{-1}$ verificaram redução do crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* devido o tratamento com estes óleos essenciais e nas concentrações testadas.

Em suma, as características de sistemicidade e inespecificidade da RSA, de atoxidez dos indutores à mamíferos e o baixo custo que podem apresentar, aliadas ao aumento na segurança alimentar, tornam o uso de elicitores na produção de alimentos promissor, principalmente no controle de podridões pós-colheita.

2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E CONTROLE DE PODRIDÃO-PARDA E PODRIDÃO-MOLE EM PÊSSEGOS ‘CHIMARRITA’ ARMAZENADOS

2.1 RESUMO

As podridões causadas por *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer* destacam-se entre as doenças que mais causam perdas na cultura do pessegueiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das substâncias acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e quitosana, aplicados em pré-colheita, sobre a indução de resistência, incidência e severidade de podridão-parda e de podridão-mole e sobre os atributos de qualidade do pêssego ‘Chimarrita’, bem como, o efeito das substâncias no crescimento *in vitro* dos fungos. O experimento em pré-colheita foi conduzido nas safras 2013 e 2016. Foram realizadas quatro pulverizações com água (controle), acibenzolar-S-metil (ASM; 30 e 60 mg de i.a. L⁻¹), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (1 e 2 mL de p.c. L⁻¹), *Bacillus subtilis* (10 mL de p.c. L⁻¹) e quitosana (10 g de i.a. L⁻¹) com intervalo de uma semana, sendo a última uma semana antes da colheita. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo (0,05% v/v). Os frutos foram colhidos e separados em quatro lotes: sem inoculação (inoculação natural) e inoculação de *M. fructicola* com ferimento, *M. fructicola* sem ferimento e *R. stolonifer* com ferimento. A inoculação foi realizada no dia da colheita e, então, armazenados por 30 dias sob refrigeração (0±0,2 °C, UR 95±2%) seguidos por mais quatro dias a 20±2 °C, UR 60±5%. O experimento *in vitro*, consistiu na aplicação dos mesmos tratamentos vertidos junto ao meio BDA, vertidos em placas de Petri e, posteriormente, inserido um disco de 5 mm retirados da extremidade de crescimento das colônias puras dos dois patógenos. As substâncias avaliadas induziram o mecanismo de defesa dos frutos, através do aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e quitinase, reduzindo o desenvolvimento das doenças. Não houve efeito sobre a qualidade dos frutos nem sobre a atividade metabólica. Os tratamentos ASM (30 mg L⁻¹) e *S. cerevisiae* (1 mL L⁻¹ sem e com NaOH) não reduziram o crescimento micelial de *M. fructicola* *in vitro*. Não ocorreu redução do crescimento micelial *in vitro* de *R. stolonifer* com os tratamentos à base de ASM. Os indutores ASM (60 mg L⁻¹), *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana reduziram o desenvolvimento das doenças sem alterar os atributos de qualidade, podendo ser uma ferramenta no controle das doenças podridão-parda e podridão-mole na cultura do pessegueiro ‘Chimarrita’.

Palavras-chave: *Prunus persica*. Metabolismo secundário. Elicitores. S-metil benzo[1,2,3]tiadiazole-7-carbotioico. Pós-colheita.

2.2 INTRODUÇÃO

A podridão-parda, causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey em pêssego, destaca-se entre as principais causas de perdas, sendo a doença mais importante no cultivo do pessegueiro no Brasil e no mundo (MAY-DE MIO et al., 2004). *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill., agente causal da podridão-mole, são os principais agentes causais de podridões pós-colheita de pêssegos (MARTINS; AMORIM, 2005).

Dependendo das condições de desenvolvimento da doença, juntos podem representar perdas significativas durante o transporte, armazenagem e comercialização (WILSON et al., 1994; FORTES, 2003).

O método mais empregado para controle destas doenças é o químico, concentrando-se aplicações de fungicidas na floração e próximo ao momento da colheita, que normalmente são efetuadas com base em calendário fixo (MAY-DE MIO et al., 2008). Apesar da elevada frequência das aplicações com fungicidas, não há controle total da doença. Além da reduzida eficiência das aplicações e possibilidades dos patógenos adquirirem resistência existe o risco de contaminação dos frutos e ambiental com resíduos desses agrotóxicos.

Para se buscar um controle satisfatório das doenças e evitar as perdas pós-colheita por podridões o uso de indutores de resistência pode ser uma ferramenta adicional para o controle de doenças. Esses produtos se destacariam pelo potencial em reduzir a incidência de podridões, apresentar sistemicidade, inespecificidade e baixo risco à saúde e ao ambiente (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002; MÉTRAUX; NAWRATH; GENOUD, 2002).

Os produtos indutores de resistência têm a capacidade de sensibilizar a planta, ativando seu sistema de defesa, mimetizando um patógeno ou desencadeando a rota metabólica de resposta à infecção (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002; TERRY; JOYCE, 2004). Assim sendo, segundo Conrath, Pieterse e Mauch-Mani (2002), a principal característica dos indutores seria a sensibilização dos mecanismos de defesa da planta à presença de patógenos junto a não ação direta sobre o patógeno. No entanto, o controle da severidade e incidência de doenças alcançada pelos indutores pode ser resultado do efeito indutor à planta associado ao efeito direto sobre o patógeno, reduzindo a germinação de esporos e o crescimento micelial (OLIVEIRA et al., 2014). Outra possibilidade de controle das doenças, pelos indutores de resistência, seria devido à maior antibiose por conta de microrganismos antagônicos aos patógenos (LU et al., 2014).

Tendo em vista essas características e potencialidades, abundantes são os trabalhos científicos com indutores de resistência, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido β -aminobutírico em ervilha (BARILLI et al., 2012), quitosana em feijoeiro (DI PIERO; GARDA, 2008), *Saccharomyces cerevisiae* em eucalipto (BOAVA et al., 2010), em citros (TOFFANO; FIALHO; PASCHOLATI, 2017) e em maçã (STELLA et al., 2013), *Bacillus subtilis* em mirtilo (NGUGI et al., 2005).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a aplicação pré-colheita das substâncias acibenzolar-S-metil (Bion® 500WG Syngenta, Basel, Suíça), mananoligossacárido fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (AgroMos®, Alltech, Lexington, EUA),

Bacillus subtilis (Serenade®, Basf, Ludwigshafen, Alemanha) e quitosana sobre a indução de resistência, incidência e severidade de podridão-parda (*Monilinia fructicola*) e de podridão-mole (*Rhizopus stolonifer*) e sobre os atributos de qualidade de pêssegos ‘Chimarrita’.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação do efeito das substâncias acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e quitosana sobre o desenvolvimento das podridões parda e mole, realizaram-se experimentos *in vivo* e *in vitro*. O experimento *in vivo* consistiu na aplicação, em duas safras, 2013 e 2016, dos produtos em pré-colheita. Na primeira, utilizou-se um pomar comercial localizado no município de Urussanga, SC, implantado no ano de 2004. Na safra de 2016, utilizou-se um pomar comercial no município de Pinto Bandeira, RS, implantado em 1991. A condução das plantas em ambos os pomares era em vaso e a produtividade média foi de 16 e 14,5 toneladas por hectare para os pomares de Urussanga e de Pinto Bandeira, respectivamente. Os tratamentos com os produtos indutores foram realizados em caráter adicional ao tratamento fitossanitário empregado pelos produtores, que seguiam o sistema integrado de produção de frutas.

As plantas de pessegueiro foram pulverizadas com acibenzolar-S-metil, obtido do produto comercial (p.c.) Bion® 500WG (Syngenta, Basel, Suíça), nas doses de 30 e de 60 mg de ingrediente ativo (i.a.) L⁻¹; mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, AgroMos® (Alltech, Lexington, EUA) nas doses de 1 e 2 mL de p.c. L⁻¹; *Bacillus subtilis*, Serenade® (Basf, Ludwigshafen, Alemanha) na dose de 10 mL de p.c. L⁻¹; quitosana à 10 g de i.a. L⁻¹ e o tratamento controle, água e surfactante não-iônico copolímero poliéster-polimetil siloxano Break Thru® (Evonik, São Paulo, Brasil) na dose de 0,5 mL de i.a. L⁻¹.

O volume de calda aplicado foi de 1.000 L ha⁻¹, para obter o completo molhamento das folhas, no ponto máximo de retenção, quando ocorriam os primeiros escorrimientos da calda. No preparo dos tratamentos, adicionou-se o surfactante copolímero poliéster-polimetil siloxano na concentração de 0,05% v/v. Para o tratamento com quitosana, inicialmente foi dissolvido em ácido acético glacial, em pH 4, resultando numa solução de 1%, sendo posteriormente completado com água e adicionado o surfactante.

As aplicações iniciaram um mês antes da colheita, totalizando quatro aplicações, com intervalo de uma semana, sendo que a última aplicação ocorreu uma semana antes da colheita dos frutos.

O delineamento experimental empregado no experimento a campo *in vivo* foi o de blocos ao acaso. Cada bloco, no primeiro ano, consistiu, em cinco plantas, que receberam os tratamentos fitossanitários, já no segundo, o bloco correspondeu a 3 plantas. Os frutos foram colhidos no terço médio da copa, excluindo-se as plantas das extremidades, e separados em seis lotes no primeiro ano de execução e em quatro no segundo.

Os lotes do primeiro ano corresponderam a: lote 1, 20 frutos por bloco, destinados a análise de maturação; lote 2, 20 frutos, por bloco, inoculados com *Monilinia fructicola* com ferimento; lote 3, 20 frutos inoculados com *Monilinia fructicola* sem ferimento; lote 4, 20 frutos inoculados com *Rhizopus stolonifer* com ferimento; lote 5, 20 frutos com inoculação natural, onde se realizaram análises de maturação após a armazenagem, e lote 6, 40 frutos, sem inoculação, para as análises bioquímicas, sendo coletadas na saída da câmara e após 6 dias em temperatura ambiente. No segundo ano não foi realizado a inoculação do patógeno *Monilinia fructicola* em frutos com ferimento.

Os frutos dos lotes 1, 2, 3, 4 e 5 foram mantidos em armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C, UR $95\pm2\%$), por 30 dias, mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$.

Os ferimentos consistiram em duas perfurações, na região equatorial, em lados opostos realizados com uma ponteira de aço inox com 2 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento equipada no texturômetro eletrônico TAXT-Plus® (Stable Micro System, Surrey, Reino Unido). A profundidade do ferimento foi de 5 mm, onde foi inoculado 50 µL de uma solução de água destilada esterilizada com TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Estados Unidos; 0,02% v/v) contendo 10^6 esporos mL⁻¹ dos respectivos patógenos, retiradas de colônias puras de 7 dias de desenvolvimento. Na inoculação de *M. fructicola* sob a epiderme íntegra, sem ferimento dos frutos, utilizou-se um pedaço de papel filtro com formato quadrado e área de 1 cm². A fonte de inóculo foi uma solução de mesma concentração, 10^6 esporos mL⁻¹, onde os pedaços de papel foram imergidos por três vezes e, na última, mantido submerso por 5 segundos.

Os dados de incidência e severidade foram quantificados diariamente, iniciando na saída da câmara até 4 dias sob a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$. Com uma régua plástica transparente, mediuse o diâmetro maior e o menor das lesões. A fim de se obter o diâmetro médio das lesões, os dados foram calculados conforme a fórmula a seguir:

$$S = \Sigma_D / 2 * N_{Ti} \quad (1)$$

Onde, S = severidade da amostra; Σ_D = somatório de todos os diâmetros; N_{Ti} = número total de inoculações.

Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

A AACPDs foi determinada com a fórmula:

$$\text{AACPDs} = \Sigma [(S_i + S_{i+1})/2.(T_{i+1}-T_i)] \quad (2)$$

Onde, AACPDs = área abaixo da curva de progresso da doença, severidade; S_i = severidade da doença, diâmetro médio da lesão iésima observação; S_{i+1} = severidade da doença, diâmetro médio da lesão na avaliação $i + 1$; T_i = tempo em dias da iésima observação; T_{i+1} = dias da avaliação $i + 1$. A S_i foi calculada com a soma dos diâmetros médios das lesões, dividida pelo total de ferimentos ou de frutos (lotes sem ferimentos).

Para a área abaixo da curva de progresso da doença de incidência (AACPD_i), foi utilizada a mesma Fórmula (1), no entanto, ao invés da severidade S_i , se teve a incidência I , obtida pela fórmula:

$$I = (N_i / N_t) * 100 \quad (3)$$

Onde, I = incidência em %; N_i = número de frutos/inoculações com lesões dos patógenos, dependendo do lote de frutos; N_t = número total de frutos/inoculações.

As análises de maturação e qualidade foram realizadas os frutos dos lotes que não sofreram inoculação. As avaliações ocorreram no momento da colheita e após 30 dias de armazenagem ($0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, UR $95 \pm 2\%$) mais quatro dias sob $20 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 5\%$. Foi avaliada a acidez titulável (AT), sólidos solúveis (SS), firmeza de polpa (FP), ângulo *hue* (h°), luminosidade (L), cromaticidade (C), taxa respiratória e de produção de etileno.

Para avaliar a indução de resistência pelas substâncias aplicadas, procedeu-se as análises bioquímicas de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase (PO), da β -1,3-glucanase, da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, teor de açúcares totais e de açúcares redutores. O material vegetal para as análises bioquímicas foi amostrado do lote 6, no primeiro ano. Amostraram-se 10 frutos por tratamento, no momento da colheita e seis dias após. Dos frutos, foram coletadas amostras da polpa, duas fatias em forma de cunha, retiradas no sentido longitudinal em lados opostos dos frutos. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer na temperatura de -50°C até a realização das análises.

Para a determinação do teor de proteína total foi utilizado o método de Bradford (1976), sendo a albumina de soro bovino utilizada como padrão. Para a elaboração do extrato a ser utilizado na quantificação de proteínas totais e nos ensaios enzimáticos pesou-se 1 g de peso fresco do tecido vegetal, sendo triturado em almofariz e cadiño na presença de 1,0 g de polivinilpirrolidona insolúvel (PVP), tamanho da partícula 110 µm (Luka® Analytical, Seelze, Alemanha), de 0,5 g de microesferas de vidro, também conhecidas como pérolas de vidro, tamanho das partículas 425-600 µm, (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e de 0,3 g da resina Dowex® 1-X8, 200-400 mesh (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Posteriormente a trituração, o material foi alocado em tubos de ensaio adicionando 10 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 8,8, com 1 mM de ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA), 1 mM de ditiotreitol (DTT) e 50 Mm de ácido ascórbico. Logo após, os extratos foram centrifugados a 20.000 g, a -4 °C por um período de 30 minutos. Para a determinação do teor de proteína total e das atividades das enzimas quitinase e β-1,3-glucanase foram utilizados os sobrenadantes.

Para a determinação espectrofotométrica da atividade de quitinase, a liberação de fragmentos solúveis foi avaliada a partir da quitina carboximetilada, utilizando-se o remazol brilhante violeta como marcador, conforme o descrito em Mazaro et al. (2012).

A atividade da β-1,3-glucanase foi determinada através do método colorimétrico, utilizando como substrato uma solução de carbocimetilcurdlan-remazol azul brilhante CM-Curdlan-RBB 4 mg mL⁻¹ (Loewe Biochemica, Munique, Alemanha), conforme o descrito por Guzzo e Martins (1996). O resultado foi expresso em U. Abs. min⁻¹ mg proteína⁻¹ min⁻¹.

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) foi quantificada segundo o descrito por Umesha (2006), através da espectrofotometria do ácido transcinâmico a partir do substrato fenilalanina. Retirou-se do extrato dos ensaios enzimáticos uma alíquota de 1 mL adicionando-se 3,0 mL do tampão tris(hidroximetil)aminometano – ácido clorídrico (TRIS – HCl) em pH 8. A leitura foi a 450 nm, comparado com curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico, sendo o resultado expresso em U. Abs. min⁻¹ mg proteína⁻¹ min⁻¹.

A atividade da enzima PO foi determinada conforme o método descrito por Matsuno e Uritani (1972). A trituração foi semelhante à realizada para determinação de proteínas totais adicionando-se 5 mL da solução de extração tampão fosfato 0,05 M, com pH 7, sendo centrifugado a 4.000 g sob a temperatura de 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante constituiu o extrato enzimático sendo vertido em um tubo de ensaio. Desse extrato foram retirados 2 mL adicionando-se: 0,5 mL de água oxigenada numa concentração de 3 %; 5 mL da solução tampão citrato em pH 5 e 0,5 mL de guaiacol a 0,5 %. Incubou-se por um período de 15 minutos na

temperatura de 30 °C. Após o período de incubação as amostras sofreram resfriamento em gelo por 5 minutos. Com a intensão de se parar a reação, foi adicionado 0,5 mL de bissulfito de sódio. Após o período de repouso, as amostras foram lidas através da espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm.

A metodologia empregada para a determinação do teor de açúcares totais foi a desenvolvida por Dubois et al. (1956), conhecida por método fenol-sulfúrico. O Tampão utilizado foi o fosfato 0,2 M com pH 7,5 utilizado 5 mL do tampão fostato, sendo submetidas a centrifugação por 5 minutos a rotação de 10.000 g. Foi pipetado, do extrato, 2 µL e acrescentado 0,5 mL de fenol a 5 % juntamente com 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para as leituras foi utilizado o comprimento de onda de 490 nm sendo a concentração alcançada por uma curva padrão de glicose. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹.

Para a quantificação de açúcares redutores o método empregado foi o desenvolvido por Miller (1959) conhecido como dinitrosalicilato (DNS). Para tal empregou-se o mesmo tampão utilizado na análise de açúcares totais, porém com o volume de 10 µL. A centrifugação foi à 14.000 g a 4 °C por 10 minutos. Do extrato pipetou-se 0,5 µL sendo acrescentados 1 mL de água deionizada juntamente com 1 mL do reagente DNS. O comprimento de onda foi de 590 nm sendo também utilizada uma curva padrão de glicose para o cálculo, com os resultados em mg g⁻¹.

A acidez titulável (AT) foi obtida através de 10 mL de suco das amostras transversais do fruto em formato de cunha, extraído em uma centrífuga. O suco foi diluído em 90 mL de água destilada e a titulação efetuada com uma solução de NaOH 0,1N até pH 8,1 e os dados expressos em meq 100 mL⁻¹.

Os valores de sólidos solúveis foram obtidos por meio de uma amostra do suco, o mesmo da variável AT, submetida a refratometria digital com o refratômetro PR201α (Atago®, Tóquio, Japão) e expressos em °Brix.

A firmeza de polpa foi determinada na região equatorial dos frutos, em dois lados opostos, após remoção da epiderme onde foi realizada a penetração, com o auxílio de um penetrômetro eletrônico, modelo GS-14® (GÜZZ, Strand, África do Sul) equipado com uma ponteira de 7 mm de diâmetro. Sendo os seus valores expressos em Newtons (N).

As variáveis *h°*, L e C foram efetuadas com o auxílio de um colorímetro (CR 400, Konica Minolta®, Osaka, Japão), sendo realizadas quatro leituras na porção vermelha da epiderme do fruto e na porção coberta pela cor de fundo, separadamente. O ângulo *hue* define a coloração básica, correspondendo, respectivamente, 0, 90 e 180° ao vermelho, ao amarelo e

ao verde. O L equivale à luminosidade variando de zero, preto, à 100, branco. O C define a cromaticidade, quanto maior mais intensa é a definição da cor.

A taxa respiratória e de produção de etileno foram quantificadas com os frutos acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado com 4,1 L de volume e septo para a coleta. A taxa de respiração foi determinada pela diferença de concentração de CO₂, dentro do recipiente, antes e após o selamento por 40 minutos. Com seringas plásticas de 1 mL amostrou-se 0,5 mL, em três seringas, a atmosfera interna do recipiente, injetando-as e quantificando os teores de CO₂ e de C₂H₄, através da cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo modelo CG-3800® (Varian, Palo Alto, CA, EUA), equipado com coluna empacotada Porapak N® de 3 m de comprimento (90-100 mesh), metanador e detector de ionização de chama. As temperaturas da coluna, detector, metanador e injetor foram de 70, 250, 380 e 130°C, respectivamente. Os fluxos de nitrogênio, hidrogênio e ar sintético foram de 30, 30 e 300 mL min⁻¹, respectivamente. Sendo o hidrogênio o gás de arraste. A atividade respiratória (nmol de CO₂ kg⁻¹ s⁻¹) e produção de etileno (μL de C₂H₄ kg⁻¹ s⁻¹) foram calculados através da fórmula proposta por Banks et al. (1995). As taxas respiratória e de produção de etileno foram quantificadas somente no primeiro ano.

Os produtos foram vertidos ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos), líquido a uma temperatura de 60 °C. Utilizou-se as mesmas doses dos tratamentos aplicados em pré-colheita. Posteriormente, vertidos em placas de Petri de 50 mm de diâmetro. Os tratamentos com mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e quitosana reduziram o pH do meio. A correção do pH foi realizada adicionando NaOH 5,0 N até retornar ao pH anterior a adição dos produtos dos referidos tratamentos que era de 5,3.

As variáveis avaliadas foram área abaixo da curva de progresso do fungo (AACPF), com base no diâmetro médio da colônia, do efeito dos tratamentos em relação ao crescimento do tratamento controle. As medidas eram realizadas diariamente até o momento em que a primeira colônia ocupasse todo o espaço da placa, 3 dias para o *Rhizopus stolonifer* e 5 dias para a *Monilinia fructicola*. Com as medidas diárias do diâmetro calculou-se a AACPF, com base na Fórmula (2), onde o crescimento do fungo correspondia ao diâmetro médio da colônia. O delineamento utilizado para o experimento *in vitro* foi o inteiramente casualizado, com dez repetições por tratamento. O experimento *in vitro* foi repetido três vezes.

Os dados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias Tukey ($p<0,05$), com auxílio do software SAS® (Statistical

Analysis System, Cary, EUA). Para os atributos bioquímicos também foi realizado análise de correlação utilizando o mesmo software estatístico.

2.4 RESULTADOS

Nos frutos sob inoculação natural, após 30 dias de armazenamento refrigerado mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, ASM (60 mg L^{-1}), *S. cerevisiae*, nas duas doses, *B. subtilis* e quitosana apresentaram os menores valores de AACPD para a incidência de *M. fructicola* do que o controle, em ambas as safras (Tabela 1). O tratamento com ASM (30 mg L^{-1}) apenas reduziu a AACPD, em relação ao controle, na safra de 2013, porém com menor efetividade que os demais tratamentos (Tabela 1). A AACPD para incidência de *R. stolonifer* foi menor nos tratamentos ASM (60 mg L^{-1}), *S. cerevisiae*, nas duas doses, *B. subtilis* e quitosana, na safra 2013, no entanto não houve diferença entre os tratamentos na safra 2016 (Tabela 1).

Tabela 1 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a incidência de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer* com inoculação natural, em pêssegos ‘Chimarrita’ tratados com elicitores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C/UR $95\pm2\%$) mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, nas safras de 2013 e 2016.

Tratamento	AACPD incidência			
	Safra 2013		Safra 2016	
	<i>M. fructicola</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>R. stolonifer</i>
Controle	46,7a	15,0a	130,4a	4,5 ns
ASM (30 mg L^{-1})	15,0b	10,0a	99,8ab	5,4
ASM (60 mg L^{-1})	0,0c	0,0b	44,6c	0,0
<i>Sc</i> (1 mL L^{-1})	1,7c	0,0b	58,1bc	0,0
<i>Sc</i> (2 mL L^{-1})	0,0c	0,0b	74,2bc	0,0
<i>Bs</i> (10 mL L^{-1})	0,0c	0,0b	55,2bc	0,0
Qt (10 g L^{-1})	0,0c	0,0b	53,2bc	0,0
C.V.(%)	26,2	24,5	27,4	312,0

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, dose de ingrediente Ativo (i.a.) Sc: mananoligossacarídeo fosofrilado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, dose de produto Comercial (p.c.) Bs: *Bacillus subtilis*, dose de p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose de i.a. ns: não significativos ($p<0,05$). Fonte: produção próprio autor.

Todos os tratamentos avaliados reduziram os valores de AACPD para severidade de podridão parda em frutos inoculado com ferimento. Contudo, os melhores resultados foram observados nos tratamentos quitosana e *S. cerevisiae*, que não diferiram de *B. subtilis* (Tabela 2). A AACPD para a incidência de *M. fructicola* inoculada com ferimento não apresentou diferenças entre tratamentos, apresentando 100% de incidência em todos os tratamentos na

saída da câmara (Tabela 2). Por este motivo, na safra 2016 a inoculação de *M. fructicola* com ferimento não foi realizada.

Para os frutos inoculados com *M. fructicola* sem ferimento, na safra de 2013, os tratamentos *Bs*, *Qt* e *Sc* (2 mL L⁻¹) apresentaram os menores valores de AACPD para severidade, porém sem diferir do tratamento ASM (60 mg L⁻¹). O tratamento controle apresentou o maior valor de AACPD para a severidade, seguido pelo tratamento ASM (30 mg L⁻¹), que não diferiu do *S. cerevisiae* (1 mg L⁻¹). A AACPD de incidência de *M. fructicola* também foi maior no tratamento controle, estando em segundo o ASM (30 mg L⁻¹), em posições intermediárias estariam ASM (60 mg L⁻¹), *S. cerevisiae* (1 mL L⁻¹) e quitosana, e menor nos tratamentos *B. subtilis* e *S. cerevisiae* (2 mL L⁻¹) (Tabela 2). A AACPD para severidade e incidência de *R. stolonifer* foi similar ao observado para *M. fructicola* inoculada sem ferimento (Tabela 2).

Tabela 2 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a severidade e incidência de *Monilinia fructicola* inoculado sem e com ferimento e de *Rhizopus stolonifer* inoculado com ferimento, em pêssegos ‘Chimarrita’, inoculados no dia da colheita, tratados com elicitores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado (0±0,2 °C, UR 95±2%) mais 4 dias a 20±2 °C, UR 60±5%, na safra 2013.

Tratamento	<i>Monilinia fructicola</i> (inoculado sem ferimento)		<i>Monilinia fructicola</i> (inoculado com ferimento)		<i>Rhizopus stolonifer</i> (inoculado com ferimento)	
	AACPD		AACPD		AACPD	
	severidade	incidência	severidade	incidência	severidade	incidência
Controle	147,3a	324,2a	50,8a	200,0 ^{n.s.a.}	50,8a	262,5a
ASM (30 mg L ⁻¹)	77,4b	248,3b	16,7b	200,0	16,7b	67,6b
ASM (60 mg L ⁻¹)	52,7cd	209,8bc	15,6bc	200,0	15,6bc	39,8cd
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	66,5bc	207,6bc	17,4b	200,0	17,4b	42,0c
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	36,8d	165,0c	11,8d	200,0	11,8d	36,7cd
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	33,8d	186,4c	13,0cd	200,0	13,1cd	20,7d
<i>Qt</i> (10 g L ⁻¹)	35,7d	191,3bc	11,3d	200,0	11,3d	20,2d
C.V. (%)	7,6	10,4	50,8	-	2,5	12,7

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ^{n.s.a.}Não se aplica. C.V. coeficiente de variação em %. ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. *Bs*: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. *Qt*: quitosana em pH 4, dose em i.a. Fonte: produção próprio autor.

De maneira geral, os resultados da safra 2016 repetiram os da safra 2013, sobretudo na AACPD da severidade e da incidência de *M. fructicola* e na severidade de *R. stolonifer*, onde o controle e o ASM (30 mg L⁻¹) apresentaram maiores valores (Tabela 3). Os tratamentos ASM (60 mg L⁻¹), *S. cerevisiae* (1 e 2 mL L⁻¹), *B. subtilis* e quitosana reduziram a AACPD para severidade nos dois patógenos, sem diferir entre si (Tabela 3). Quanto à incidência de *R.*

stolonifer, somente os tratamentos *B. subtilis* e quitosana apresentaram valores menores do que o controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para a severidade e incidência de *Monilinia fructicola* inoculado sem ferimento e de *Rhizopus stolonifer* inoculado com ferimento, em pêssegos ‘Chimarrita’, inoculados no dia da colheita, tratados com elicitores em pré-colheita, após 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2$ °C, UR 95±2%) mais 4 dias a 20 ± 2 °C, UR 60±5%, na safra 2016.

Tratamento	<i>Monilinia fructicola</i> (inoculado sem ferimento)		<i>Rhizopus stolonifer</i> (inoculado com ferimento)	
	AACPD		AACPD	
	severidade	incidência	severidade	Incidência
Controle	203,8a	263,0a	112,2a	180,1a
ASM (30 mg L ⁻¹)	164,6a	263,6a	90,3ab	163,4abc
ASM (60 mg L ⁻¹)	34,8b	88,0b	76,0bc	165,6ab
Sc (1 mL L ⁻¹)	36,3b	117,8b	66,4c	162,1abc
Sc (2 mL L ⁻¹)	36,1b	129,6b	59,2c	133,5abc
Bs (10 mL L ⁻¹)	22,7b	82,0b	55,8c	122,7bc
Qt (10 g L ⁻¹)	19,9b	93,0b	58,0c	111,9c
C.V.(%)	27,9	30,6	14,4	14,8

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). nsDiferença entre médias, na coluna, não significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. Bs: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose em i.a.
Fonte: produção próprio autor.

No experimento *in vitro*, a incorporação de ASM em meio de cultura não alterou a AACPF de *R. stolonifer* em ambas doses e de *M. fructicola* na menor dose. A maior dose de ASM reduziu em 7 % a AACPF de *M. fructicola* em relação ao controle (Tabela 4). O tratamento com *S. cerevisiae* a 1 mg L⁻¹ com e sem a correção do pH do meio não interferiu no crescimento micelial de *M. fructicola*, contudo, para *R. stolonifer*, o tratamento reduziu 70 e 60% o crescimento micelial com e sem correção do pH, respectivamente (Tabela 4). A dose de 2 mg L⁻¹ *S. cerevisiae* sem a correção de pH reduziu a AACPF de *M. fructicola* em 29 % e com a correção em 7%, no entanto, o *R. stolonifer* apresentou maior sensibilidade sendo que não foi observado crescimento no tratamento sem a adição de NaOH, e, com a correção, houve crescimento micelial, porém com uma redução de 89% da AACPF (Tabela 4). O tratamento com *B. subtilis* inibiu completamente o crescimento de *M. fructicola* e *R. stolonifer* o tratamento reduziu 40% a AACPD (Tabela 4). A aplicação de somente quitosana inibiu em 17 e 16% o crescimento micelial de *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente (Tabela 4). Nos tratamentos com quitosana mais ácido acético com ou sem correção do pH não se observou crescimento micelial de *M. fructicola* e *R. stolonifer* (Tabela 4).

Tabela 4 – Área abaixo da curva de progresso do fungo (AACPF), com base no crescimento micelial *in vitro*, de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, com os elicidores vertidos junto ao meio BDA, incubados por sete dias para *M. fructicola* e por 3 dias para *R. stolonifer* em câmara BOD 25±1 °C, foto período de 12 horas.

Tratamento	AACPD severidade	
	<i>M. fructicola</i>	<i>R. stolonifer</i>
Controle	154,8ab	123,6a
ASM (30 mg L ⁻¹)	167,3a	114,2ab
ASM (60 mg L ⁻¹)	144,1c	115,6ab
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	147,1bc	37,2f
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹) + NaOH	161,6ab	49,3e
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	88,2e	0,0h
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹) + NaOH	114,6d	14,0g
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	0,0f	73,0d
Qt (10 g L ⁻¹)	128,9cd	103,3c
Qt (10 g L ⁻¹) + Ac. acético	0,0f	0,0h
Qt (10 g L ⁻¹) + Ac. acético + NaOH	0,0f	0,0h
C.V.(%)	12,9	11,2

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey($p<0,05$). C.V. coeficiente de variação em %. ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. *Bs*: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose em i.a. Fonte: produção próprio autor.

O teor de proteínas totais foi menor para o tratamento controle na saída da câmara e após 4 dias a 20±2 °C, *S. cerevisiae* (2 mL L⁻¹) e quitosana apresentaram maiores teores de proteínas totais, na saída da câmara e após 4 dias a 20±2 °C, respectivamente, estando os demais tratamentos em posições intermediárias (Tabela 5).

A atividade da enzima peroxidase (PO), na saída da câmara, foi 1.310% maior para o tratamento com quitosana, 1.010% para *B. subtilis* e 1.000% para *S. cerevisiae* (2 mL L⁻¹) sendo que o ASM (30 mg L⁻¹) não diferiu do controle e os demais tratamentos ocuparam posição intermediária (Tabela 5). Após 4 dias a 20±2 °C, os tratamentos *S. cerevisiae* (2 mL L⁻¹), *B. subtilis* e quitosana apresentaram maiores atividade da enzima PO estando os demais tratamentos em equivalência ao tratamento controle (Tabela 5).

Na saída da câmara foi observado maior atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) nos frutos tratados com quitosana e com *B. subtilis*, estando o ASM (30 mg L⁻¹) em igualdade com o controle e os demais tratamentos em posição intermediária (Tabela 5). Após 4 dias (20±2 °C), manteve-se a igualdade da atividade da FAL entre os tratamentos controle e ASM (30 mg L⁻¹) sendo o *S. cerevisiae* (1 mL L⁻¹) o tratamento com maior atividade (Tabela 5).

Não foi observada atividade da enzima quitinase no tratamento controle nem no tratamento ASM (30 mg L^{-1}) na saída da câmara e após 4 dias ($20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Tabela 5). Os demais apresentaram atividades de quitinase equivalentes entre si na saída da câmara sendo que após 4 dias ($20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$) os tratamentos *S. cerevisiae* (1 e 2 mL L^{-1}) e *B. subtilis* tiveram a maior atividade (Tabela 5).

Os açúcares totais não apresentaram diferença entre tratamentos e os açúcares redutores foram maiores nos tratamentos *S. cerevisiae* (1 e 2 mL L^{-1}), *B. subtilis* e quitosana na saída da câmara mantendo-se *S. cerevisiae* (2 mL L^{-1}), *B. subtilis* e quitosana com os maiores teores após 4 dias ($20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o tratamentos controle e ASM (30 mg L^{-1}) os menores (Tabela 5).

Não foi observada atividade da enzima glucanase em nenhum dos tratamentos no período analisado(dados não apresentados).

O teor de proteínas totais, atividade da FAL, da quitinase e da PO se correlacionaram negativamente com o AACPD da severidade e da incidência de *M. fructicola* inoculado com e sem ferimento, e de *R. stolonifer* inoculado com ferimento (Tabela 6). O coeficiente de correlação entre o teor de proteína total e PO, FAL e quitinase foi de 0,68, 0,64 e 0,65, respectivamente, após 4 dias ($20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$) da saída da câmara.

Não houve diferença dos atributos de qualidade: firmeza de polpa, acidez, sólidos solúveis, ângulo *hue* da região vermelha e da verde, respiração e produção de etileno em pêssegos ‘Chimarrita’, armazenados por 30 dias a $0\pm0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na saída da câmara, e após mais 4 dias a $20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$ na safra de 2013 (Tabela 7). Na safra de 2016 não se repetiu as análises metabólicas de respiração e de produção de etileno sendo que os demais atributos tiveram comportamento semelhantes não diferindo entre si (Tabela 8).

Tabela 5 – Teores de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase (PO), da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, teor de açúcares totais e de açúcares redutores

em pêssegos ‘Chimarrita’, armazenados por 30 dias a $0\pm0,2$ °C, UR $95\pm2\%$, na saída da câmara e após 4 dias a 20 ± 2 °C, UR $60\pm5\%$, safra 2013.

Tratamento	Proteínas Totais (mg g ⁻¹)	Peroxidase (U.E. min ⁻¹)	FAL (U.abs. mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	Quitinase (U.E. mg ⁻¹ proteína)	Açúcares totais (mg g ⁻¹)	Açúcares Redutores (10 ³ mg g ⁻¹)
- - - Saída da câmara - - -						
Controle	0,504d	0,591d	0,017b	0,000b	72,18 ^{ns}	0,112b
ASM(30 mg L ⁻¹)	0,798bc	0,565d	0,012b	0,000b	73,25	0,125b
ASM(60 mg L ⁻¹)	0,723c	2,537c	0,118ab	0,858a	71,13	0,128b
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	0,897ab	1,588c	0,115ab	1,277a	72,09	0,205a
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	1,034a	6,490c	0,109ab	0,975a	75,51	0,212a
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	0,885b	6,571b	0,170a	1,459a	76,99	0,207a
Qt (10 g L ⁻¹)	0,936ab	8,322a	0,178a	1,653a	74,66	0,198a
C.V. (%)	7,6	18,3	24,4	22,8	6,4	11,5
- - - 4 dias a 20 ± 2 °C - - -						
Controle	0,356c	1,256b	0,022c	0,000c	73,76 ^{ns}	0,081c
ASM(30 mg L ⁻¹)	0,748b	2,436b	0,014c	0,000c	78,55	0,089c
ASM(60 mg L ⁻¹)	0,965b	2,204b	0,080b	0,887ab	76,07	0,183ab
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	0,847b	2,140b	0,114a	1,045a	63,51	0,191ab
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	0,832b	8,573a	0,101ab	1,005a	69,68	0,233a
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	0,977b	6,946a	0,083ab	0,899a	67,49	0,237a
Qt (10 g L ⁻¹)	1,332a	6,917a	0,078b	0,676b	66,10	0,231a
C.V. (%)	12,8	17,3	19,3	14,3	16,3	23,6

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

^(ns)Diferença entre médias, na coluna, não significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. *Bs*: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose em i.a. Fonte: produção próprio autor.

Tabela 6 – Coeficientes de correlação entre os atributos bioquímicos de teores de proteínas totais, atividade da enzima peroxidase, da fenilalanina amônia-liase (FAL), da quitinase, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em severidade e em incidência de *Monilinia fructicola* inoculado sem e com ferimento e de *Rhizopus stolonifer* inoculado com ferimento em pêssegos ‘Chimarrita’, armazenados por 30 dias a 0±1°C, UR 95±2%, na saída da câmara e após 4 dias a 20±2 °C, UR 60±5%, safra 2013.

	Proteínas totais		FAL		Quitinase		Peroxidase	
	Saída	4 dias	Saída	4 dias	Saída	4 dias	Saída	4 dias
<i>M. fructicola</i> sem ferimento								
AACPD	incidência	-0,78***	-0,67***	-0,69***	-0,72***	-0,62***	-0,71***	-0,62***
	severidade	-0,82***	-0,81***	-0,69***	-0,63***	-0,67***	-0,72***	-0,73***
<i>M. fructicola</i> com ferimento								
AACPD	incidência	n.s.a.	n.s.a.	n.s.a.	n.s.a.	n.s.a.	n.s.a.	n.s.a.
	severidade	-0,83***	-0,77***	-0,56**	-0,55**	-0,58**	-0,64***	-0,56**
<i>R. stolonifer</i> com ferimento								
AACPD	incidência	-0,78***	-0,62***	-0,62***	-0,71***	-0,62***	-0,60***	-0,64***
	severidade	-0,83***	-0,78***	-0,55**	-0,55**	-0,58**	-0,64***	-0,56**

*** Significativo a 0,1% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade. n.s.a Não se aplica.

Tabela 7 – Firmeza de polpa (N), acidez (meq 100 ml⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), cor da epiderme (h°), respiração (mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) e produção de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹) em pêssegos ‘Chimarrita’, não inoculados, submetidos a tratamento pré-colheita com indutores, após 30 dias de armazenamento (0±1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%), safra 2013.

Tratamento	Firmeza de polpa (N)	Acidez (meq 100mL ⁻¹)	Sólidos solúveis	Cor da epiderme (h°)		Respiração	Produção de etileno
				Região vermelha	Região verde		
- - - colheita - - -							
Controle	89,9 ^{n.s.}	6,8 ^{n.s.}	11,4 ^{n.s.}	44,2 ^{n.s.}	109,1 ^{n.s.}	10,6 ^{n.s.}	10,2 ^{n.s.}
ASM(30 mg L ⁻¹)	87,2	6,7	10,8	49,4	108,7	11,6	13,5
ASM(60 mg L ⁻¹)	92,0	6,5	11,3	49,8	108,4	12,5	15,6
Sc (1 mL L ⁻¹)	89,9	6,2	10,8	46,9	107,9	12,6	12,3
Sc (2 mL L ⁻¹)	88,4	6,0	10,9	47,8	104,2	11,9	12,2
Bs (10 mL L ⁻¹)	91,1	6,3	10,7	44,6	107,3	12,3	12,5
Qt (10 g L ⁻¹)	86,8	6,0	11,1	40,6	106,2	12,6	12,9
C.V.(%)	7,2	8,4	3,4	15,4	2,5	9,7	26,6
- - - 30 dias a 0 °C mais 4 dias à 20 °C - - -							
Controle	10,4 ^{n.s.}	4,3 ^{n.s.}	11,6 ^{n.s.}	33,4 ^{n.s.}	96,7 ^{n.s.}	18,2 ^{n.s.}	14,6 ^{n.s.}
ASM(30 mg L ⁻¹)	11,1	4,4	12,4	32,7	96,8	13,3	16,9
ASM(60 mg L ⁻¹)	12,2	4,7	11,4	30,6	98,4	15,1	19,6
Sc (1 mL L ⁻¹)	10,8	4,9	12,1	31,6	97,1	15,6	15,2
Sc (2 mL L ⁻¹)	10,0	4,2	12,7	32,9	97,3	15,4	15,1
Bs (10 mL L ⁻¹)	11,0	4,2	11,6	32,3	96,7	14,9	15,6
Qt (10 g L ⁻¹)	10,7	4,1	12,4	33,8	98,2	15,2	15,6
C.V.(%)	14,8	8,7	5,7	16,5	3,8	16,8	19,4

^{n.s.}Diferença entre médias, na coluna, não significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. Bs: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose em i.a. Fonte: produção próprio autor.

Tabela 8 – Firmeza de polpa (N), acidez (meq 100 ml⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), cor da epiderme (h°) em pêssegos ‘Chimarrita’, não inoculados, submetidos a tratamento pré-colheita com indutores, após 30 dias de armazenamento (0 ± 1 °C/UR de $95\pm2\%$) mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$), safra 2016.

Tratamento	Firmeza de polpa (N)	Acidez (meq 100mL ⁻¹)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Cor da epiderme (h°)	
				Região vermelha	Região verde
- - - colheita - - -					
Controle	53,2 ^{ns}	5,5 ^{ns}	8,6 ^{ns}	29,4 ^{ns}	96,7 ^{ns}
ASM(30 mg L ⁻¹)	52,9	5,8	8,8	29,9	96,4
ASM(60 mg L ⁻¹)	53,5	5,8	8,5	32,5	98,4
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	52,6	5,4	7,3	28,3	96,5
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	50,8	5,9	7,7	29,8	93,7
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	52,8	6,0	8,1	32,5	97,2
Qt (10 g L ⁻¹)	50,7	5,7	7,2	30,0	94,2
C.V.(%)	17,8	9,3	11,3	5,2	2,5
- - - 30 dias a 0 °C mais 4 dias à 20 °C - - -					
Controle	5,2 ^{ns}	3,4 ^{ns}	9,2 ^{ns}	33,1 ^{ns}	87,4 ^{ns}
ASM(30 mg L ⁻¹)	4,4	3,2	9,4	32,7	88,4
ASM(60 mg L ⁻¹)	4,8	2,9	8,9	33,0	90,6
<i>Sc</i> (1 mL L ⁻¹)	4,6	3,2	8,0	33,2	87,3
<i>Sc</i> (2 mL L ⁻¹)	5,1	3,3	9,2	34,7	88,1
<i>Bs</i> (10 mL L ⁻¹)	5,3	3,5	9,0	33,3	86,5
Qt (10 g L ⁻¹)	4,9	3,6	8,7	31,0	83,8
C.V.(%)	15,8	12,2	5,7	6,5	2,3

^{ns}Diferença entre médias, na coluna, não significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ASM: acibenzolar-S-metil, dose em i.a. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, dose em p.c. *Bs*: *Bacillus subtilis*, dose em p.c. Qt: quitosana em pH 4, dose em i.a. Fonte: produção próprio autor.

2.5 DISCUSSÃO

O ASM na dose de 30 mg L⁻¹ não reduziu de forma consistente a manifestação das doenças estudadas (Tabelas 1, 2 e 3) e também não alterou a atividade das proteínas relacionadas a patogênese quitinase, FAL, PO (Tabela 6) possivelmente pela dose baixa incapaz de desencadear o processo de indução de resistência (SIEGRIST et al., 1997). Resultados semelhantes foram encontrados por Soares, Maringoni e Lima (2004), que não observaram efeito do ASM na indução de resistência do feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. Contudo na dose de 60 mg L⁻¹ de ASM observou-se redução do desenvolvimento dos patógenos *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer* nos frutos (Tabelas 1, 2 e 3). Diversos trabalhos encontraram resultados semelhantes mostrando o efeito indutor do ASM e a capacidade de retenção do desenvolvimento de doenças em diversos patossistemas como *Blumeria graminis* em trigo (GÖRLACH et al., 1996); *Peronosclerospora sorghi* em milho (MORRIS et al., 1998); *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate (LOUWS et al., 2001); *Trichothecium roseum* em melão (GE et al., 2015) e *Fusarium*

oxysporum em alface (GILARDI et al., 2016). O efeito dos tratamentos com ASM seria indireto no controle da podridão-parda, através da RSA, pois houve incremento na atividade de proteínas relacionadas a patogênese (Tabela 6), e não foi observada a redução do crescimento micelial *in vitro* para o patógeno *R. stolonifer* (Tabela 4). Para *M. fructicola* os efeitos direto e indireto poderiam ter ocorrido, uma vez que houve diminuição do crescimento *in vitro* de *M. fructicola* na dose de 60 mg L⁻¹ (Tabela 4).

A redução na ocorrência de doenças nos tratamentos com *S. cerevisiae* também foi observado por Dantas et al. (2004) em pós-colheita de mamão, por Gouvea et al. (2009) em morango e por Nally et al., (2012) em pós-colheita de uvas de mesa. Esses autores relacionaram o controle das doenças com a indução de resistência pelo aumento da atividade de proteínas relacionadas a patogênese como: a FAL e PO, além da quitinase. Os resultados das análises fitopatológicas e das bioquímicas refletem a capacidade indutora do mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *S. cerevisiae*, que ao ser reconhecido pela planta desencadeia o processo de RSA.

O controle de podridão-parda e podridão-mole pode ter sido favorecido pelo efeito direto do produto comercial AgroMos® (Tabela 4). Em trabalho desenvolvido por Costa et al. (2010), conduzido com o produto comercial AgroMos® e com o mesmo produto sem sulfato de cobre em sua formulação, aplicados no meio de cultura e posteriormente inoculados com *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, foi observado que possivelmente o maior efeito do produto comercial AgroMos®, na inibição do crescimento da colônia do patógeno, seria devido à presença do Cu⁺⁺ em sua formulação comercial. Contudo, os autores testaram doses mais altas que as do presente trabalho, tendo a máxima dose de 57 mL L⁻¹. No presente trabalho, o Cu⁺⁺ poderia ter sofrido o processo de quelatização por moléculas orgânicas presentes no meio de cultura, reduzindo assim sua toxicidade e não alterando significativamente o crescimento micelial de *M. fructicola* no tratamento com 1 mL L⁻¹ de *S. cerevisiae* (Tabela 4). Os resultados *in vitro* para *S. cerevisiae* demonstram diferença entre a suscetibilidade dos patógenos ao AgroMos® e que as causas diretas do produto podem estar associadas a presença de Cu⁺⁺ e a redução do pH do meio de cultura pela a adição de AgroMos®.

O total controle dos patógenos no tratamento *B. subtilis* na safra 2013 (Tabela 1) nos frutos inoculados naturalmente e o menor desenvolvimentos das doenças nos demais (Tabelas 2 e 3) foi alcançado pelo poder indutor de *B. subtilis*, evidenciado no presente trabalho pela maior atividade das enzimas FAL, PO e quitinase (Tabela 5), somados a ação direta que o tratamento teve sobre os patógenos onde inibiu totalmente o crescimento micelial de *M. fructicola* e reduziu abundantemente o crescimento de *R. stolonifer* (Tabela 4). O controle de

podridão-mole com *Bacillus subtilis* também foi encontrado por Wang et al. (2013). Os autores utilizaram tratamentos com *Bacillus subtilis* cepa SM21 que se mostraram eficientes no controle de podridão-mole (*R. stolonifer*) em pêssegos ‘Baifeng’, quando aplicados em ferimento e posteriormente inoculados com esporos de *R. stolonifer*. Outros trabalhos também encontraram resultados positivos no emprego de *B. subtilis* no controle de patógenos como de *Fusarium oxysporum* em *Artemisia selengens* (CHEN et al., 2017). Segundo Ongena e Jacques (2008) muitos foram os trabalhos que relataram indução de resistência de plantas a patógenos quando aplicado *B. subtilis* por exemplo: algodão a *Meloidogyne* sp.; pepino a *Colletotrichum* sp.; tomate a TMV (*tomato mosaic virus*), *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. e a *Fusarium* sp. Essa ação direta sobre os patógenos pode estar associada aos lipopeptídeos produzidos por diversas espécies de *Bacillus* e presentes no produto comercial utilizado no experimento Serenade® (ONGENA; JACQUES, 2008). Dentre os lipopetídeos, três famílias são produzidas pelo gênero *Bacillus*, sendo elas fengicinas, surfactinas e iturinas (ONGENA; JACQUES, 2008) que apresentam propriedades surfactantes, rompendo as membranas dos patógenos, propiciando o extravasamento do líquido celular e posterior lise das células (FIEDLER; HEERKLOTZ, 2015).

A retenção do desenvolvimento da podridão-parda e podridão-mole observada no presente trabalho, com a aplicação de quitosana, está associada a capacidade de induzir a resistência sistêmica adquirida que o composto apresenta somadas ao seu efeito antifúngico. Diversos trabalhos citam o efeito indutor da quitosana (ZHANG; QUANTICK, 1997; FAJARDO et al., 1998; ZHANG; QUANTICK, 1998; MAZARO et al., 2008; LOU et al., 2011; ROMANAZZI et al., 2002; LIU et al., 2007; AUBEL et al., 2016). Após percebido pela epiderme do vegetal, a quitosana desencadeia a expressão de genes relacionados à resistência (ZHANG et al., 2015), acumulando e/ou aumentando a atividade de enzimas como fenilalanina amônia-liase, peroxidase e quitinase (DURRANT; DONG, 2004). Observou-se efeito direto da quitosana sobre os patógenos quando somente a quitosana foi vertida e dissolvida ao meio de cultura, (Tabela 4). Devido a quitosana se comportar como um cátion, há uma facilitação de sua interação com componentes que agem como ânions na membrana plasmática dos patógenos, ocorrendo assim o extravasamento do líquido celular (KONG et al., 2010), principalmente pela possível competição do composto com o Ca⁺ pelos sítios de ligação eletronegativos presentes na superfície das membranas (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

O aumento do teor de proteínas totais pode estar associado à maior síntese, devido ao desencadeamento da RSA, de proteínas relacionadas à patogênese, como a quitinase, e a outras proteínas que atuam na defesa das plantas contra os patógenos como lizosimas e osmotinas

(VAN-LOON et al., 2006). A menor quantidade de proteínas totais no tratamento controle (Tabela 5) juntamente com a correlação positiva entre o teor de proteínas totais e a atividade das enzimas PO, FAL e quitinases, citadas no item resultados evidenciação a relação entre o teor de proteínas totais e a maior atividade das enzimas relacionadas a patogênese.

As enzimas FAL e PO, que são enzimas chave do processo de RSA (CAVALCANTI et al., 2005), foram ativadas (Tabela 5) e sua correlação com a incidência e severidade das doenças é negativa (Tabela 6). Possivelmente essa correlação é resultado do processo de lignificação em que estão envolvidas. A FAL catalisa a reação de deaminação da fenilalanina para o ácido cinâmico sendo iniciada a síntese de lignina pela polimerização de produtos iniciais da rota dos fenilpropanóides (STICHER et al., 1997). Infere-se à PO a catalisação do último passo da formação da lignina (WOJTASZEK, 1997). Com a intensificação da lignificação através da maior atividade das enzimas FAL e PO a parede celular se torna mais protegida inibindo a infecção e o desenvolvimento dos patógenos.

A quitinase não teve atividade detectada no tratamento controle (Tabela 5) e também possui correlação negativa com os quesitos de desenvolvimento dos patógenos (Tabela 6). A atuação antimicrobiana da enzima está associada ao seu poder catalizador da hidrólise dos polímeros de quitina que compõe a parede celular dos fungos (VAN-LOON et al., 2006).

A elevação do teor de açúcares redutores nos tratamentos com os indutores (Tabela 5) pode ter sido resultado da demanda energética gerada pela ativação do metabolismo secundário e da síntese, acúmulo e ativação das proteínas relacionadas a patogênese.

Não foi observado diferenças entre tratamento para os atributos de qualidade avaliados em ambas as safras, não havendo efeito de tratamento na maturação e no amadurecimento dos frutos durante o armazenamento (Tabela 7 e 8). Mazaro et al. (2008) relataram alterações em alguns atributos de qualidade em resposta a altas doses de quitosana em morango, associado a fitotoxidez. Por outro lado, no mesmo trabalho os autores não observaram efeito da quitosana no teor de sólidos solúveis ao mesmo tempo que observaram melhor manutenção da firmeza em frutos tratados com quitosana. A alteração dos atributos de qualidade e metabólicos por parte dos elicitores não se encontra conclusivamente descrita na literatura, sofrendo influência do elicitador utilizado, do material vegetal e do nível de alteração do metabolismo secundário que o elicitador desencadeia.

2.6 CONCLUSÕES

As aplicações em pré-colheita de ASM (60 mg L^{-1}), mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana reduziram o desenvolvimento da podridão-parda e da podridão-mole em pêssegos ‘Chimarrita’.

ASM, mananoligossacarídeo de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana alteraram os atributos bioquímicos dos frutos, ativando as proteínas relacionadas a patogênese, como a peroxidase, fenilalanina amônia-liase e quitinase.

Os compostos ASM, mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana induziram a resistência, atuando na resistência sistêmica adquirida.

Os tratamentos com mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana, além da capacidade indutora de resistência, agem diretamente sobre os patógenos, reduzindo seu crescimento micelial *in vitro*.

Os tratamentos não interferiram nos atributos de qualidade e metabólicos dos frutos.

3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon nardus*, *Citrus reticulata* E *Corymbia citriodora* COMO ALTERNATIVA NO MANEJO DE PODRIDÕES EM PÊSSEGOS ‘CHIMARRITA’

3.1 RESUMO

As perdas causadas pelas doenças podridão-parda (*Monilinia fructicola*) e podridão-mole (*Rhizopus stolonifer*) podem ser substanciais e poucas são as alternativas para o controle em pós-colheita. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*) aplicado via fumigação, nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, sobre o desenvolvimento da podridão-parda e podridão-mole em pêssegos ‘Chimarrita’ armazenados e dos seus agentes causais *in vitro*, bem como sobre a qualidade dos frutos após o armazenamento. Também foi identificada a composição dos óleos essenciais utilizados. No experimento *in vitro* os óleos foram fumigados no interior das placas de Petri. Utilizou-se um adesivo colado na tampa onde aplicaram-se os óleos. Foram avaliados o crescimento micelial, a produção e a germinação de esporos. No experimento *in vivo*, após a colheita os frutos foram separados em três grupos, um inoculado com *M. fructicola*, outro com *R. stolonifer* e o terceiro sem inoculação. Utilizou-se um recipiente plástico para acondicionar os frutos e fumigar os óleos essenciais de citronela, tangerina e eucalipto, durante o período de armazenamento refrigerado. Os frutos foram armazenados por 30 dias a 0±0,2 °C seguido por mais 4 dias a 20±2 °C. Foi avaliado no experimento *in vivo* a área abaixo da curva de progresso da doença, com base na incidência (AACPD_i) e severidade (AACPD_s), a produção de esporos por cm² da lesão e a viabilidade de esporos para os dois patógenos. Também foram avaliados os atributos de qualidade e as taxas respiratória e de produção de etileno. Observou-se que os óleos essenciais avaliados apresentaram de 10 a 23 compostos de diferentes classes moleculares (terpenos, terpenoides e fenilpropanoides), em diferentes concentrações. A aplicação dos óleos essenciais das três espécies vegetais avaliadas reduziu o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de *M. fructicola* e *R. stolonifer*. A dose de 1.000 µL L⁻¹ do óleo de citronela e de eucalipto causaram fitotoxidez e incrementaram a taxa de produção de etileno, e o óleo de eucalipto aumentou a respiração e causou menor firmeza de polpa e acidez titulável. Os demais quesitos de qualidade não sofreram alterações com a aplicação dos óleos essenciais.

Palavras-chave: *Prunus persica*. Fitotoxidez. Controle alternativo. Terpenoides. Citronelal. Citronelol. Limoneno.

3.2 INTRODUÇÃO

As perdas por podridões que ocorrem na cadeia produtiva do pessegueiro são significativas no Brasil (AMORIN et al., 2008) e no mundo (LARENA et al., 2005), mesmo com os cuidados fitossanitários adotados.

O controle da podridão-parda e podridão-mole se inicia em pré-colheita, com aplicação de fungicidas, mas poucas são as alternativas disponíveis em pós-colheita para auxiliar o manejo fitossanitário. Para a podridão-mole (*Rhizopus stolonifer*) existe somente um fungicida

com registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, no site AGROFIT em 22 de fevereiro de 2017, para uso em pós-colheita. Já para a podridão-parda (*Monilinia fructicola*), que é a principal doença pós-colheita em pêssego (PAVANELLO et al., 2015a), não há nenhum produto registrado.

Apesar do método químico de controle, com sucessivas aplicações ao longo do ciclo, iniciando na floração e estendendo-se até próximo a colheita, ser o mais empregado para o controle das doenças (MAY-DE MIO et al., 2008) e ser considerado como o método mais eficiente (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009; PAVANELLO et al., 2015b), grandes perdas ocorrem devido a incidência de doenças (FORTES, 2003; PAVANELLO et al., 2015 a,b). Além disso, se empregado somente o método químico, sem a devida atenção ao manejo adequado da cultura, pode se perder a eficiência de moléculas no controle das doenças. O produto benomil aplicado amplamente para controlar *M. fructicola*, perdeu sua eficiência em consequência da resistência desenvolvida pelo patógeno (MAY DE MIO et al., 2004). Novas moléculas surgiram para atender a demanda de controle da doença, como o tebuconazol. No entanto essas também estão sujeitas a se tornarem ineficientes.

Além do desenvolvimento de resistência às moléculas, o uso frequente e indiscriminado de produtos químicos gera problemas ambientais e efeitos negativos à saúde do produtor rural, que manuseia o agrotóxico concentrado, bem como a do consumidor, devido aos resíduos possivelmente existentes nos frutos, que podem ser carcinogênicos e teratogênicos (SKANDAMIS et. al., 2001). Na busca de uma agricultura mais sustentável, a utilização de métodos de controle alternativos ao químico ou associados a esses, no entanto, mais econômicos e menos tóxicos é um caminho. Além disso, haveria a possibilidade de campanhas de *marketing* mais eficientes, aproveitando o nicho de mercado crescente, onde consumidores buscam alimentos seguros que foram produzidos com responsabilidade ambiental e respeito a saúde humana. Nesse contexto, se enquadra o uso de extratos vegetais e óleos essenciais como uma alternativa de baixo custo onde o material vegetal poderia ser cultivado, e extraído seu óleo essencial pelo próprio produtor.

Os óleos essências são constituídos de metabólitos secundários das plantas, que apresentam características voláteis e de baixo peso molecular, compreendendo principalmente os compostos fenólicos, fenilpropanoides, terpenos e terpenoides (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006; BAKKALI et al., 2008; MARČETIĆ et al., 2016).

Produtos derivados de plantas são utilizados desde o século XIX para o controle de insetos e doenças, como os à base de *Nicotiana* spp., fonte de nicotina, *Chrysantemum*

cinerariaefolium, *C. roseum*, *C. coccineum*, fontes de piretrina e *Derris* spp., de rotenona (DE MORAES, 2009).

O óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), com alto teor de terpenoides, possui ação antimicrobiana (ANDRADE et al., 2012), mostrando-se útil na desinfecção de superfícies metálicas (OLIVEIRA et al. 2010). O potencial antimicrobiano do óleo essencial de citronela pode ser usado para o controle de fungos fitopatogênicos. Pereira et al. (2012) observaram redução das doenças causadas por *Hemileia vastatrix* e *Cercospora cafeeicola* em cafeiro com o uso de óleo essencial de citronela.

Outro óleo essencial, que se destaca pela sua disponibilidade, devido à elevada oferta gerada pelo resíduo das agroindústrias nacionais, é o de tangerina (*Citrus reticulata*). O Brasil é um grande exportador de suco de laranja (FAO, 2015) e essa grande produção gera uma elevada quantidade de resíduos caracterizados por restos de polpa, cascas e sementes provenientes do processo de esmagamento (FARIAS-SILVA et al., 2016). Uma alternativa de destinação poderia ser a extração de óleo essencial para utilização no controle de doenças pós-colheita. Estudos têm demonstrado o potencial dos óleos essenciais de citros e seus componentes na redução do crescimento micelial e na germinação de esporos de *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (DROBY et al., 2008; WANG et al., 2012).

Em estudos realizados por Ramenazi et al. (2002) foi observado grande ação antifúngica do óleo de eucalipto (*Corymbia citriodora*), sendo mais potente que o fungicida sintético mancozeb no controle *in vitro* dos patógenos: *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria triticina*, *Rhizoctonia solani* e *Alternaria solani*. O potencial do óleo de eucalipto citriodora na inibição da germinação de esporos foi observado por Medice et al. (2007), onde a concentração de 1% inibiu 100% da germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* em meio ágar-água. Também foi encontrado por Dias-Arieira et al. (2010) controle do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro com o uso do óleo essencial de eucalipto citriodora.

Tendo em vista as dificuldades de controle das doenças pós-colheita na cultura do pessegueiro juntamente com o potencial dos óleos essenciais, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) aplicados via fumigação, nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, sobre o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* dos agentes causais da podridão-parda e podridão-mole em pêssegos ‘Chimarrita’ armazenados, bem como sobre a qualidade dos frutos após o armazenamento.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para determinar a ação antifúngica do óleo essencial de citronela desenvolveu-se experimentos *in vivo* e *in vitro*. Para o experimento *in vivo*, foram colhidos frutos de pessegoiro cultivar Chimarrita, de um pomar comercial localizado em Urussanga, SC, na safra de 2013, que no momento da colheita apresentavam, 91,7 N, 5,4 meq 100mL⁻¹, 11,2 °Brix e 106,8 °hue de firmeza de polpa, acidez titulável, sólido solúveis e cor de fundo, respectivamente. Os frutos foram separados em três grupos, feridos e inoculados com *Monilinia fructicola*, feridos e inoculados com *Rhizopus stolonifer*, além dos frutos mantidos sob inoculação natural, conforme o descrito no capítulo um. Foi efetuado um ferimento por fruto tendo o cuidado de evitar o contato do ferimento com a superfície do recipiente e com outros frutos no momento da armazenagem. Os fungos utilizados nos experimentos foram isolados a partir de frutos apresentando sintomas das doenças podridão-parda e podridão-mole, provenientes do mesmo pomar que os utilizados para implantar os experimentos. Após a inoculação alocaram-se 12 frutos, constituindo a unidade amostral, em recipientes plásticos de 4,1 L de volume interno. Foram aplicados os óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) sob fumigação nas doses de 0, 50, 100 e 1.000 µL L⁻¹. Para a realização da aplicação dos tratamentos, foi vertida a quantia correspondente de óleo em um frasco de aproximadamente 50 mL que foi mantido junto aos frutos. Após reservar o óleo a ser volatizado junto aos frutos, os recipientes de 4,1 L foram selados com filme plástico de policloreto de vinila (PVC) moldável. Para se conseguir as concentrações desejadas foi utilizada a fórmula abaixo:

$$C_f \cdot V_l = C_{oe} \cdot V_{oe} \quad (4)$$

C_f : concentração de óleo essencial fumigada em µL L⁻¹; V_l : volume livre (L) no interior do recipiente onde os frutos foram alocados; C_{oe} : concentração do óleo essencial (1.000 µL L⁻¹); V_{oe} : volume calculado de óleo essencial a ser vertido no frasco e mantido junto aos frutos durante o período de armazenamento.

O volume livre foi determinado descontando-se dos 4,1 L do recipiente, o volume de frutos e o volume do frasco para a aplicação do óleo essencial. O volume de frutos alocados no recipiente foi determinado pela seguinte fórmula:

$$V_f = M_f \cdot D_{mf} \quad (5)$$

V_f : volume dos frutos (l); M_f : massa dos frutos (kg); D_{mf} : densidade média do pêssego ‘Chimarrita’ (g cm^{-3}). Para a determinação da densidade média, foram utilizados os mesmos frutos para a caracterização da maturação, três repetições de 60 frutos. Para o cálculo da densidade média dos frutos pesaram-se individualmente os frutos e, também de forma individual, se determinou o empuxo resultante da imersão do fruto em um recipiente com água, sem tocá-lo dos lados e nem no fundo, sobre uma balança analítica. O valor lido na balança corresponde ao empuxo, e, conhecendo-se a massa específica da água, pode-se chegar ao volume deslocado de água, que é igual ao volume do fruto. Com a divisão das massas dos frutos por seus volumes encontrou-se a densidade média do fruto.

Após o selamento, os frutos foram armazenados em câmara fria a $0\pm0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $95\pm2\%$ por 30 dias. Os frutos foram analisados na saída da câmara e por mais quatro dias a $20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $60\pm5\%$ quanto à área abaixo da curva de progresso da doença para a incidência (AACPDi) e para a severidade (AACPDs), conforme descrito no primeiro capítulo.

Os atributos de qualidade firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL^{-1}), sólidos solúveis (°Brix), respiração ($\text{mL CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$) e de produção de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4\text{ kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$) foram quantificados após 30 dias de armazenamento refrigerado mais quatro dias de exposição dos frutos a $20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme descrito no primeiro capítulo.

Avaliou-se a produção e a viabilidade de esporos, após a saída da câmara mais 4 dias a $20\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Com auxílio de um bisturi cirúrgico número 22, retiraram-se as estruturas fúngicas presentes sob cada uma das lesões de *M. fructicola* e *R. stolonifer*, coincidindo com o ferimento da inoculação, numa área de 1 cm^2 , colocando-as em tubos de Eppendorf, com $1,5\text{ mL}$ de uma solução de Tween® 20 (0,05% v/v) em água destilada autoclavada. Após agitar em agitador mecânico de tubos tipo Vortex, por cerca de 5 segundos, foi quantificada, através de um hemacitômetro e microscópio óptico, a quantidade de esporos produzidos, conforme Fernandez (1993). Verteram-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de 4 tubos Eppendorf, pegos aleatoriamente, de cada tratamento, em uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro contendo meio ágar-água. O conteúdo dos tubos Eppendorf foi vertido de forma equidistante na placa de Petri. Após 48h contaram-se um total de 100 esporos por conteúdo do tubo Eppendorf, e os esporos viáveis, que apresentavam crescimento do tubo germinativo igual ou maior que seu raio, assim determinando a viabilidade dos esporos.

Os experimentos *in vitro*, consistiram em aplicar o óleo essencial citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*) nas mesmas doses que o *in vivo*, via fumigação, no interior das placas de Petri, com discos retirados

de colônias puras de *M. fructicola* e *R. stolonifer*, conforme descrito no experimento *in vitro* do capítulo anterior. A aplicação do óleo no interior da placa de Petri foi realizada através do método do disco de papel, *paper disc method*, descrito por Asghari et al. (2009), com adaptações. A aplicação consistiu em colar um adesivo na parte superior interna, tampa, da placa de Petri, vertendo-se gentilmente no adesivo, evitando o escorrimento, o volume de óleo necessário para se alcançar a concentração a ser avaliada. Para determinar o volume de óleo a ser aplicado, utilizou-se a fórmula (4), onde V₁ corresponderia ao volume interno livre da placa.

O percentual de controle da lesão (PC) foi calculado com base na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com base na severidade, correspondendo ao diâmetro médio das colônias, sendo o PC obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{PC (\%)} = [(AACPD_{\text{sc}} - AACPD_{\text{soe}}) / AACPD_{\text{sc}}] * 100 \quad (6)$$

Onde, AACPD_{sc} = área abaixo da curva de progresso da doença, severidade, do tratamento controle; e AACPD_{soe} área abaixo da curva de progresso da doença, severidade, dos tratamentos com diferentes doses de óleo essencial de citronela.

A determinação da AACDPs, bem como as condições de incubação, para o experimento *in vitro* foram as mesmas descritas no capítulo um.

A produção de esporos, no experimento *in vitro*, foi obtida vertendo-se uma solução de 10 mL de água destilada autoclavada e Tween® 20 (0,05% v/v), no interior da placa, fazendo-se uma leve raspagem com espátula de plástico para liberar os esporos, utilizando um hemacitômetro e microscópio, semelhante ao descrito por Fernandez (1993).

A viabilidade de esporos foi obtida da mesma maneira que no experimento *in vivo*, sendo utilizados os esporos provenientes da solução de contagem que determinou a produção de esporos.

Através do ajuste de equações de regressão estimou-se a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), com base no crescimento micelial. Devido a inibição total do crescimento de *M. fructicola* a partir da dose de 50 µL L⁻¹ do óleo de citronela, menor dose utilizada no experimento *in vivo*, desenvolveu-se outro experimento com as doses de 1, 2, 3, 4 e 8 µL L⁻¹ para então se encontrar a CI₅₀. Para o óleo de tangerina, as doses utilizadas foram 0, 1, 2, 4 e 8%, devido à baixa sensibilidade do patógeno *R. stolonifer* ao óleo.

Os óleos essenciais utilizados nesse trabalho tiveram sua composição química definida no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Agroindústria Tropical. Utilizou-se a cromatografia gasosa e

espectrometria de massa para a quantificação dos compostos químicos do óleo, conforme Ribeiro et al. (2015).

Os experimentos seguiram o delineamento inteiramente casualizado tendo o *in vivo* quatro repetições e o *in vitro* 10 repetições por tratamento. Os dados de AACPDs, AACPDi e PC foram submetidos a análise de regressão e os de qualidade e de produção e viabilidade de esporos à análise de contrastes ortogonais polinomiais pelo programa estatístico SAS. Os dados de viabilidade de esporos dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram transformados pela equação arco-seno $[(x+0,5)/100]^{1/2}$ antes da análise de regressão.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*)

O óleo essencial de citronela utilizado no presente trabalho apresentou como compostos principais o citronelal, geraniol e citronelol, que juntos representaram 68% dos voláteis, sendo o mais abundante o citronelal com 36,18% (Tabela 9). Estão presentes no óleo essencial de citronela 23 compostos pertencentes a cinco classes moleculares, sendo a dos monoterpenoides responsável por 55,47% da área relativa (Tabela 9). Resultados semelhantes foram encontrados por Kapoviessi et al. (2014), que trabalhando com *Cymbopogon nardus* oriundos de Benin, país do continente africano, encontraram 28 compostos, sendo também o citronelal o composto em maior concentração no óleo essencial com 35,9 %. Castro et al. (2007), trabalhando com citronela cultivada na região norte do Brasil, Andrade et al. (2012) e Oliveira et al. (2010), utilizando plantas provenientes da região sudeste do Brasil, encontraram valores de área relativa semelhante ao presente trabalho. Apesar de a síntese e o acúmulo dos metabólitos secundários ser variável e dependente de muitos fatores como estresses abióticos, herbivoria e alterações climáticas, a composição do óleo essencial de citronela utilizado no presente trabalho se apresentou similar aos utilizados em outros trabalhos.

A aplicação via fumigação do óleo essencial de citronela a 50, 100, 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença para a incidência (AACPDi), tanto para o patógeno *M. fructicola* quanto para o *R. stolonifer* (Figura 1). Na dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ houve aumento da AACPDi para os dois patógenos, sendo que para *R. stolonifer* esse aumento foi menos intenso (Figura 1).

Para a AACPDs a aplicação do óleo de citronela teve comportamento semelhante a AACPDi, porém, sem o incremento final na dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 1). A redução da

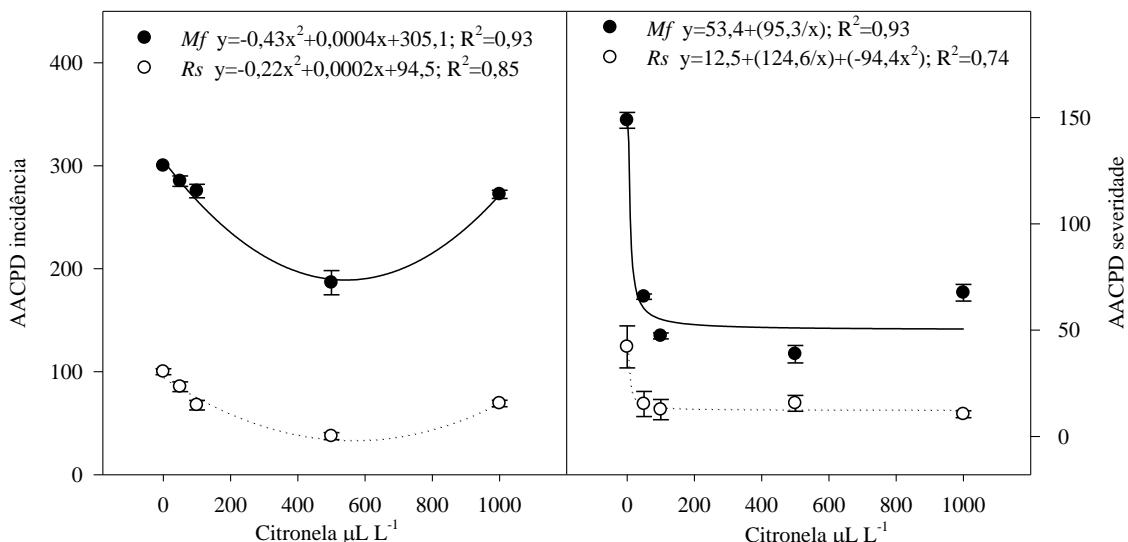
AACPDS foi menos acentuada para o patógeno *R. stolonifer* do que para *M. fructicola* (Figura 1).

Tabela 9 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), determinados por de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

Composto	IK	Área Relativa (%)	Classe Molecular
citronelal	1153	36,18	Monoterpenóide
geraniol	1252	18,85	Monoterpenóide
citronelol	1225	12,82	Monoterpeno
elemol	1549	4,24	Sesquiterpeno
acetato de citronelol	1352	3,60	Monoterpeno
δ -cadineno	1523	3,52	Sesquiterpeno
limoneno	1029	3,20	Monoterpeno
β -elemeno	1390	3,00	Sesquiterpeno
acetato de geranila	1381	2,87	Monoterpeno
germacreno-d	1484	2,13	Sesquiterpeno
α -eudesmol	1653	1,45	Sesquiterpenoide
muurolol	1646	0,93	Sesquiterpenóide
α -muuroleno	1500	0,92	Sesquiterpeno
γ -cadineno	1513	0,91	Sesquiterpenóide
isopulegol	1049	0,87	Monoterpeno
germanocreno-d-4-ol	1575	0,70	Sesquiterpeno
eugenol	1359	0,68	Fenilpropanóide
germanocreno-a	1509	0,60	Sesquiterpeno
iso-isopulegol	1159	0,53	Monoterpeno
Linalol	1098	0,52	Monoterpeno
γ -eudesmol	1632	0,52	Sesquiterpeno
β -eudesmol	1650	0,51	Sesquiterpenoide
Geranal	1267	0,44	Monoterpenóide

IK: Índice Kovats, coluna HP-5. Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Figura 1 – Área abaixo da curva de progresso da doença da incidência (AACPD_i) e da severidade (AACPD_s) de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem ($0\pm0,2$ °C/UR de $95\pm2\%$) na presença de óleo essencial de citronela nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).



Barras verticais correspondem o erro padrão da média. R^2 : coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

A produção de esporos por cm^2 e a viabilidade de esporos diminuíram com o incremento da dose do óleo essencial de citronela, sendo a produção de esporos nula a partir de 500 e $100 \mu\text{L L}^{-1}$, respectivamente, para *M. fructicola* e *R. stolonifer* (Tabela 10). Para a viabilidade de esporos não houve diferenças relevantes, em termos de valores absolutos, entre o controle e as doses 50 e $100 \mu\text{L L}^{-1}$, para *M. fructicola*, e a dose de $50 \mu\text{L L}^{-1}$, para *R. stolonifer*, contudo ocorreu redução da viabilidade de esporos com o aumento da concentração de óleo fumigado, apresentando efeito linear e quadrático altamente significativo (Tabela 10).

Nos experimentos *in vitro* o patógeno *M. fructicola* apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial e teve porcentagem de controle (PC) de 100% para a menor dose testada ($50 \mu\text{L L}^{-1}$) (Figura 2). Para *R. stolonifer*, a PC de 100% ocorreu somente na dose de $500 \mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 2). Devido à alta sensibilidade de *M. fructicola* ao óleo essencial de citronela foram avaliadas doses menores de óleo essencial para estimar a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) (Figura 2 e Tabela 11), que foi obtida na dose de $4,11 \mu\text{L L}^{-1}$, enquanto que para *R. stolonifer* CI_{50} foi de $23,69 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 3). Neste experimento foi observado que a resposta da PC ao incremento

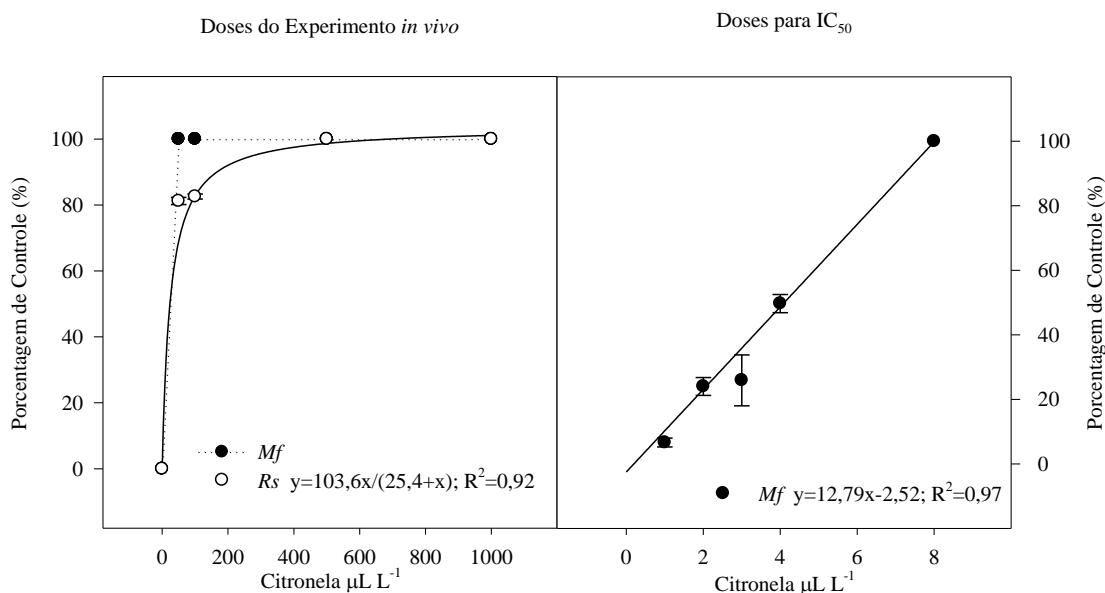
das doses foi linear, atingindo 100% de controle na dose de 8 $\mu\text{L L}^{-1}$ para *M. fructicola*, (Figura 2).

Tabela 10 – Produção (nº de esporos cm^{-2}) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos ‘Chimarrita’ inoculados com *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer* e submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ por 30 dias de armazenamento refrigerado ($0\pm0,2^\circ\text{C}/\text{UR de } 95\pm2\%$), seguidos por mais 4 dias em condições ambiente ($20\pm2^\circ\text{C}/\text{UR de } 60\pm5\%$).

Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos cm^{-2} (10^7)	Viabilidade (%)	Esporos cm^{-2} (10^6)	Viabilidade (%)
Controle	188,3	93,8	106,9	75,2
50 $\mu\text{L L}^{-1}$	53,0	95,4	19,9	72,2
100 $\mu\text{L L}^{-1}$	11,8	93,1	0	0
500 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
<i>Linear</i>	***	***	***	***
<i>Quadrático</i>	***	***	***	***
C.V. (%)	10,8	5,5	37,7	15,4

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ***significativo a 0,1 % de probabilidade de erro. Fonte: elaboração do próprio autor.

Figura 2 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPF de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação a 25 °C com o óleo essencial de citronela fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, para os dois patógenos, e nas doses de 0, 1, 2, 3, 4 e 8 µL L⁻¹, somente para *M. fructicola* submetidos à análise de regressão.



Barras verticais correspondem o erro padrão da média. R²: coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

Tabela 11 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), *in vitro*, equações de regressão e coeficiente de determinação (R²) do óleo essencial de citronela para a porcentagem de controle do crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, determinados nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, e 8 µL L⁻¹, e de *Rhizopus stolonifer* nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹.

Patógeno	CI ₅₀ (µL L ⁻¹)	Equação	R ²
<i>Monilinia fructicola</i>	4,11	y = 12,79x-2,52	0,97
<i>Rhizopus stolonifer</i>	23,69	y = 103,6x/(25,4+x)	0,92

Fonte: elaboração do próprio autor.

Para a produção e viabilidade de esporos, *in vitro*, o patógeno *M. fructicola* apresentou novamente maior sensibilidade ao óleo essencial do que *R. stolonifer* (Tabela 12). A partir da dose mínima avaliada, 50 µL L⁻¹, houve inibição da produção de esporos e consequentemente da viabilidade. A produção e viabilidade de esporos de *R. stolonifer* reduziram com o incremento nas doses do óleo essencial, com inibição a partir da dose de 500 µL L⁻¹ (Tabela 12).

Tabela 12 – Produção (10^6 mL $^{-1}$) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, incubadas à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$.

Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos mL $^{-1}$ (10^6)	Viabilidade (%)	Esporos mL $^{-1}$ (10^6)	Viabilidade (%)
Controle	101,3	97,5	56,3	80,0
50 µL L $^{-1}$	0	0	8,9	40,2
100 µL L $^{-1}$	0	0	2,3	37,1
500 µL L $^{-1}$	0	0	0	0
1.000 µL L $^{-1}$	0	0	0	0
<i>Linear</i>	***	***	***	***
<i>Quadrático</i>	***	***	***	**
C.V. (%)	55,4	6,4	38,7	29,7

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ***, **, significativo a 5 e a 1 % de probabilidade de erro, respectivamente. Fonte: elaboração do próprio autor.

Asghari et al. (2009) também controlaram doenças pós-colheita com fumigação de óleo essencial *in vivo* e *in vitro* em morango. Os autores, trabalhando com o óleo essencial de cominho (*Cuminum cyminum* L.) encontraram menor desenvolvimento de *B. cinerea* em morangos e observaram redução do crescimento micelial e da viabilidade de esporos *in vitro*. Os autores associaram a redução das podridões ao efeito direto do óleo sobre o patógeno o que também foi evidenciado por Mohammadi e Aminifard (2012). O efeito direto do óleo essencial de citronela pode ser observado no presente trabalho pelos resultados dos experimentos *in vitro* (Figura 2, Tabelas 11 e 12).

Regnier et al. (2014), trabalhando com óleo essencial de citronela com composição semelhante ao deste trabalho, encontraram redução do desenvolvimento de *Geotrichum citri-aurantii*, agente causal da podridão-azeda em tangerina. Os autores obtiveram, *in vitro*, controle de 52% do patógeno com a dose de 500 µL L $^{-1}$. Lorenzetti et al. (2011) também encontraram inibição de crescimento micelial de *Botrytis cinerea* com o óleo essencial de citronela. Regnier et al. (2011) e Lorenzetti et al. (2011) observaram efeito do óleo essencial de citronela semelhante ao dos fungicidas utilizados para o controle do patógeno. Lorenzetti et al. (2011) obtiveram controle do crescimento de isolados resistentes de *Botrytis cinerea* ao tiofanato metílico com óleo essencial de capim-limão, espécie do mesmo gênero da citronela.

A redução do desenvolvimento das doenças podridão-parda e podridão-mole ocasionada pela aplicação via fumigação do óleo essencial de citronela pode estar associada à

sua composição. Com exceção do composto eugenol, que é um fenilpropanoide e representa apenas 0,68% da área relativa, os demais compostos são terpenoides que representam 99,3% dos compostos identificados (Tabela 9). Os óleos essenciais majoritariamente compostos por terpenoides podem apresentar maior efeito antifúngico (KUNDU et al., 2013). O efeito do óleo essencial de citronela poderia ser semelhante ao óleo de tomilho, que atua na desintegração da membrana plasmática e da parede celular dos patógenos e também no acúmulo de ergosterol dos microrganismos (SVIRCEV et al., 2007; CHAVAN; TUPE, 2014).

Pode ser observado uma diferença da sensibilidade dos patógenos ao óleo de citronela entre os testes *in vivo* e os *in vitro*. *M. fructicola* teve um maior desenvolvimento *in vivo* principalmente ao analisar a AACPDi (Figura 1) e na produção de esporos (Tabela 10) em comparação ao *R. stolonifer*. No entanto, nos experimentos *in vitro* o patógeno *M. fructicola* apresentou maior suscetibilidade ao óleo, com PC de 100% a dose de 50 µL L⁻¹ (Figura 2), não produzindo esporos (Tabela 12), e a CI₅₀ foi cerca de cinco vezes menor que a do *R. stolonifer* (Tabela 11).

O maior desenvolvimento da podridão-parda pode estar associado à sua maior virulência, sendo mais capaz de causar alterações fisiológicas nos frutos que a podridão-mole. Outro fator que colaboraria para aumentar a diferença entre o desenvolvimento dos patógenos *in vivo* seria a temperatura de armazenamento, que seria baixa o suficiente para praticamente controlar o desenvolvimento da podridão-mole, que teve desenvolvimento somente após o período de prateleira (4 dias a 20±2 °C/UR de 60±5%).

A diferença entre a viabilidade de esporos *in vivo* e *in vitro* também foi observada e apesar de o tratamento com óleo *in vivo* ter reduzido o número de esporos, a viabilidade praticamente permaneceu inalterada (Tabela 9). No entanto, *in vitro* houve a redução da viabilidade de esporos (Tabela 12). Essa redução *in vitro* pode ter ocorrido pela exposição contínua dos esporos ao óleo, durante o período de incubação, e imediatamente após a incubação, ocorrer o estímulo a germinação, sendo avaliada após 48 horas. No entanto, *in vivo*, após a saída da câmara, houve a retirada dos filmes plásticos que selavam os potes e mantinham a concentração dos óleos no seu interior. Os quatro dias a 20±2 °C poderiam ter sido suficientes para reduzir a toxidez, observada *in vitro*, sobre a germinação dos esporos.

A dose de 1.000 µL L⁻¹ ocasionou fitotoxidez, tornando a epiderme e a parte imediatamente abaixo dessa com aspecto amolecido o que possivelmente está associado a elevação da AACPDi (Figura 1). Outro atributo que poderia apresentar relação com o dano causado pelo óleo seria a elevação da taxa de produção de etileno (Tabela 13). Porém, pela característica superficial do dano, não teve reflexo na perda de firmeza de polpa (Tabela 13).

Os demais atributos de qualidade não apresentaram resposta ao óleo essencial de citronela (Tabela 13).

Tabela 13 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), ângulo *hue*, taxa respiratória (mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) e de produção de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigaçāo de óleos essenciais citronela (*Cymbopogon nardus*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 μL L⁻¹ durante 30 dias de armazenamento refrigerado (0±0,2 °C/UR de 95±2%), seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).

Concentração	Firmeza	Acidez	Sólidos	<i>hue</i> °	Respiração	Produção
Controle	19,1	2,7	13,4	101,6	20,60	22,30
50 μL L ⁻¹	20,8	2,8	12,5	102,4	21,20	22,17
100 μL L ⁻¹	20,2	2,3	12,5	102,5	20,73	18,10
500 μL L ⁻¹	20,2	2,3	12,5	103,7	20,73	18,10
1.000 μL L ⁻¹	21,4	2,6	13,6	98,6	18,73	21,33
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>Quadrático</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
C.V. (%)	23,0	17,4	4,7	2,7	29,72	23,35

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ns: não significativo. *significativo a 5 % de probabilidade de erro.

3.4.2 Óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*)

O óleo essencial de tangerina estudado apresentou 10 compostos, todos pertencentes à classe molecular dos monoterpenos, sendo o limoneno o mais abundante com 85% e o segundo o γ-terpineno com 9,0% de área relativa (Tabela 6). O terceiro composto com maior concentração foi o β-mirceno, com 1,8% e o que apresentou menor área foi o linalol com 0,3% de área (Tabela 14). Resultados semelhantes foram obtidos por Tao, Jia e Zhou (2014) que, trabalhando com óleo oriundo de plantas da China, encontraram os mesmos 3 compostos como sendo os principais constituintes do óleo essencial de tangerina. No entanto, a composição do óleo apresentou 27 compostos e o limoneno representou 60,7%. Hosni et al. (2010), com óleo proveniente de plantas da Tunísia, encontraram 34 compostos e a concentração do limoneno foi de 92%. O maior número de compostos encontrado por Hosni et al. (2010) pode ter sido pela técnica mais acurada, onde compostos com teores abaixo de 0,01% foram encontrados. Outro fator que poderia ter gerado tais diferenças seria o local de produção das plantas, pois a síntese e acúmulo dos produtos do metabolismo vegetal dependem dos estímulos que as plantas estão submetidas.

Tabela 14 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*), determinados por de cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

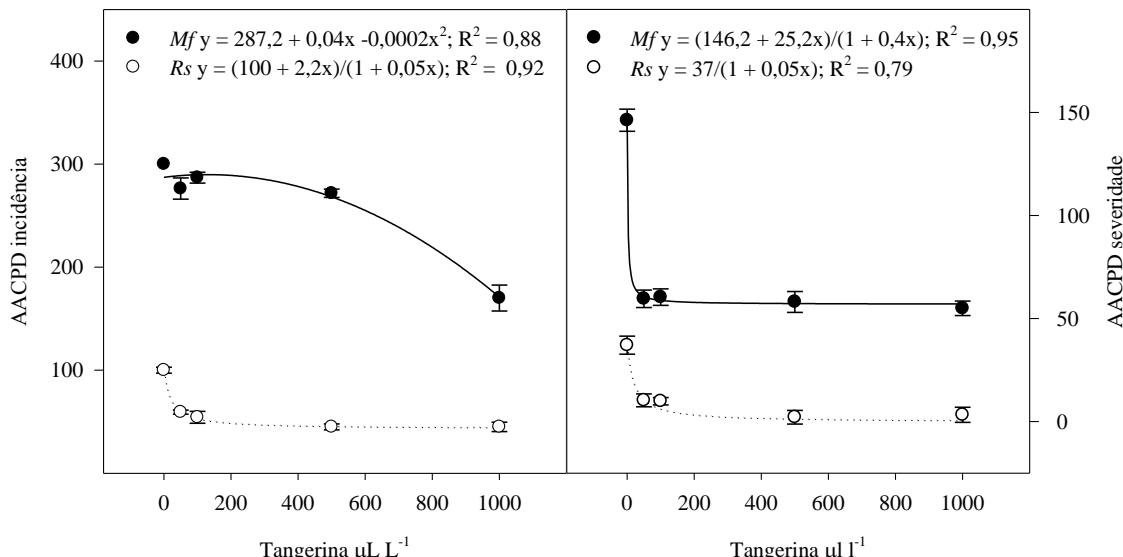
Composto	IK	Área Relativa (%)	Classe Molecular
limoneno	1029	85,39	Monoterpeno
γ -terpineno	1059	8,99	Monoterpeno
β -mirceno	990	1,75	Monoterpeno
α -pineno	939	1,34	Monoterpeno
ρ -cimene	1024	0,69	Monoterpeno
β -pineno	979	0,53	Monoterpeno
terpinoleno	1088	0,35	Monoterpeno
sabineno	975	0,34	Monoterpeno
α -tujeno	930	0,32	Monoterpeno
linalol	1098	0,29	Monoterpeno

IK: Índice Kovats, coluna HP-5. Fonte: produção do próprio autor, 2017.

Com o incremento das doses do óleo essencial de tangerina houve a redução da AACPDi para *M. fructicola*, sendo que a dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentou maior redução em relação ao controle, representando uma redução de 57% em relação ao controle (Figura 3). Para *R. stolonifer*, doses partir de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ reduziram em aproximadamente 60% a AACPDi (Figura 3). Para AACPDs de *M. fructicola* e de *R. stolonifer* o efeito do óleo de tangerina foi súbito, apresentando a partir da dose de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ uma redução de aproximadamente 40% e 25%, respectivamente (Figura 3). Vitoratos et al. (2013) avaliando o efeito do óleo essencial de limão, espécie do mesmo gênero da tangerina, sob o controle de podridões pós-colheita observaram redução no crescimento dos patógenos *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* em pepinos.

A produção de esporos de *M. fructicola* foi inibida nas lesões dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ e para *R. stolonifer* a inibição da produção de esporos ocorreu na dose de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 15). Vitoratos et al. (2013) também observou a redução da produção de esporos de *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* submetidos a vaporização do óleo essencial de *Citrus limon*. A viabilidade dos esporos produzidos por *M. fructicola* não foi alterada pela aplicação do óleo essencial de tangerina (Tabela 15).

Figura 3 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da incidência e da severidade de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem ($0\pm1^{\circ}\text{C}$) na presença de óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, e por mais 4 dias à $20\pm2^{\circ}\text{C}$, UR $60\pm5\%$.



Barras verticais correspondem o erro padrão da média. R^2 : coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

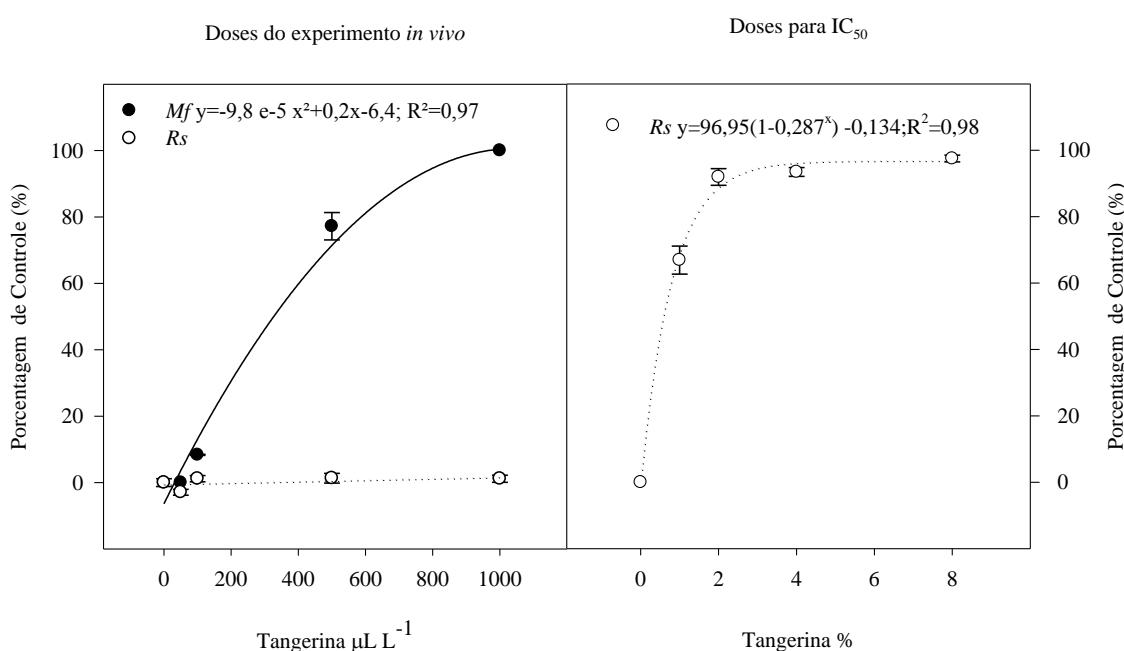
Para a porcentagem de controle *in vitro*, as doses de 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram, respectivamente, cerca de 80% e 100% de controle do crescimento micelial do patógeno *M. fructicola*. O crescimento micelial de *R. stolonifer* não sofreu redução até a dose de $1000 \mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 4). Devido à baixa sensibilidade de *R. stolonifer* ao óleo essencial de tangerina, também foram avaliadas as doses de 0, 1, 2, 4 e 8%. A dose de óleo de tangerina a 1% controlou 60% e a partir da dose de 2% praticamente houve 100% inibição do crescimento de *R. stolonifer* (Figura 4).

Tabela 15 – Produção (nº de esporos cm⁻²) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos 'Chimarrita' inoculados com *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer*, submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, após 30 dias de armazenamento (0±1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).

Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos cm ⁻² (10 ⁷)	Viabilidade (%)	Esporos cm ⁻² (10 ⁶)	Viabilidade (%)
Controle	188,3	93,8	191,5	75,2
50 µL L ⁻¹	95,7	93	0	0
100 µL L ⁻¹	53,3	93	0	0
500 µL L ⁻¹	53,4	93	0	0
1.000 µL L ⁻¹	0	0	0	0
<i>Linear</i>	***	ns	***	***
<i>Quadrático</i>	***	ns	***	***
C.V. (%)	16,1	4,4	11,0	12,3

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. *** significativo a 0,1 % de probabilidade; ns: não significativo. Fonte: elaboração do próprio autor.

Figura 4 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPD da severidade de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação à 25 °C com o óleo essencial de tangerina fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, para os dois patógenos e nas doses de 0, 1, 2, 4 e 8 %, somente para *R. stolonifer*, submetidos à análise de regressão.



Barras verticais correspondem ao erro padrão da média. R²: coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

Foi estimada em 337,99 $\mu\text{L L}^{-1}$ a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) para *M. fructicola* e em 0,583 $\mu\text{L L}^{-1}$ para *R. stolonifer* (Tabela 16). A CI_{50} do óleo essencial de tangerina foi 1.725% maior para *R. stolonifer* em comparação com *M. fructicola*, mostrando menor efeito direto do óleo sobre *R. stolonifer* (Tabela 16).

Tabela 16 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI_{50}), *in vitro*, equações de regressão e coeficiente de determinação (R^2) do óleo essencial de tangerina para porcentagem de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, determinados nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, e de *Rhizopus stolonifer* nas concentrações de 0, 1, 2, 4 e 8 %.

Patógeno	CI_{50}	Equação	R^2
<i>Monilinia fructicola</i>	337,99*	$y = -9,8e^{-5}x^2 + 0,2x - 6,4$	0,97
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,583**	$y = 96,95(1 - 0,287^x) - 0,134$	0,98

* , **: valor em $\mu\text{L L}^{-1}$ e em %, respectivamente. Fonte: elaboração do próprio autor.

Houve redução da produção de esporos, *in vitro*, para *M. fructicola* e diminuição na viabilidade de esporos para os dois patógenos, com o incremento das doses do óleo essencial de tangerina (Tabela 17). Não houve diferença na produção de esporos do patógeno *R. stolonifer* nas doses de 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 17). Vitoratos et al. (2013) encontraram, de forma semelhante ao presente trabalho, redução da produção de esporos de *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*. Phillips, Laird e Allen (2012) também observaram redução na produção e na germinação de esporos de *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata* com a aplicação de com óleo essencial de citros via fumigação.

Tabela 17 – Produção (10^6 mL $^{-1}$) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, incubadas à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L $^{-1}$.

Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos mL $^{-1}$ (10^6)	Viabilidade (%)	Esporos mL $^{-1}$ (10^6)	Viabilidade (%)
Controle	101,3	97,5	56,3	92,8
50 µL L $^{-1}$	85,7	96,0	60,2	90,5
100 µL L $^{-1}$	0	0	61,1	87,6
500 µL L $^{-1}$	0	0	59,7	81,3
1.000 µL L $^{-1}$	0	0	57,4	80,0
<i>Linear</i>	***	***	<i>Ns</i>	**
<i>Quadrático</i>	***	***	<i>Ns</i>	<i>ns</i>
C.V. (%)	42,6	6,4	16,4	10,2

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ***, significativo a 0,1 %; ** significativo a 1 % de probabilidade de erro; ns: não significativo. Fonte: elaboração do próprio autor.

A redução do crescimento micelial *in vitro* pelo óleo essencial de *Citrus reticulata* também foi observado por Tao, Jia e Zhou (2014), que trabalharam com *Penicillium italicum* e *P. digitatum*. Os autores controlaram totalmente o crescimento do micélio de *P. italicum* e *P. digitatum*, nas doses de 2.500 e 40.000 µL L $^{-1}$, respectivamente, evidenciando, de acordo com o presente trabalho, a diferença de sensibilidade ao óleo entre os patógenos. Tao, Jia e Zhou (2014) associaram o controle a citotoxicidade causada pela perda da integridade da membrana celular, causando o extravasamento dos componentes celulares dos fungos. A diferença de sensibilidade dos patógenos aos óleos essências foram claramente observadas por Simas et al. (2017), sendo que as mesmas doses do óleo de *Citrus aurantifolia* que reduziram o crescimento de *Botritis cinerea* estimularam o de *Trichoderma viride*.

Após 30 dias de armazenamento refrigerado seguidos por mais quatro a 20°C não se observou alterações nos atributos de qualidade dos frutos tratados com diferentes doses de óleo essencial (Tabela 18). No entanto, Sum et al. (2014) observaram maior firmeza de polpa em mirtilos expostos aos compostos carvacol e eugenol, provenientes de óleos essenciais. Azerêdo et al. (2016), por sua vez, observaram maior manutenção da coloração de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com óleo essencial de erva-doce (*Foeniculum vulgare*).

Tabela 18 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), ângulo *hue*, respiração (mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) e produção de etileno (μL C₂H₄ kg⁻¹ h⁻¹) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigação de óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 μL L⁻¹, após 30 dias de armazenamento (0±0,2 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20±2 °C/UR de 60±5%).

Concentração	Firmeza	Acidez	Sólidos	<i>hue</i> °	Respiração	Produção
Controle	19,1	2,7	13,4	101,6	20,60	22,30
50 μL L ⁻¹	21,1	2,3	12,9	103,4	20,63	20,20
100 μL L ⁻¹	20,4	2,2	13,3	101,4	19,93	18,23
500 μL L ⁻¹	20,6	2,6	12,5	97,8	20,27	20,43
1.000 μL L ⁻¹	20,3	2,7	12,7	101,1	19,57	19,07
<i>Linear</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>Quadrático</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C.V. (%)	15,3	17,9	19,0	12,3	34,1	34,0

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ns: não significativo a 5 % de probabilidade de erro.

3.4.3 Óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*)

Foram detectados 10 compostos hidrocarbonetos presentes no óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) sendo sete monoterpenos, dois monoterpenoides e um sesquiterpeno (Tabela 19). O composto mais abundante foi o citronelal com 80,34% seguido por isopulegol com 8,16 % e citronelol com 7,59 % da área relativa (Tabela 19). Resultados semelhantes foram encontrados por Hussein, Salem e Soliman (2017), que trabalhando com *C. citriodora* originária do Egito identificaram o citronelal (53,1%) como o composto com maior concentração. Contudo, o segundo majoritário foi citronelol (13,7%) e o terceiro acetato de citronelol.

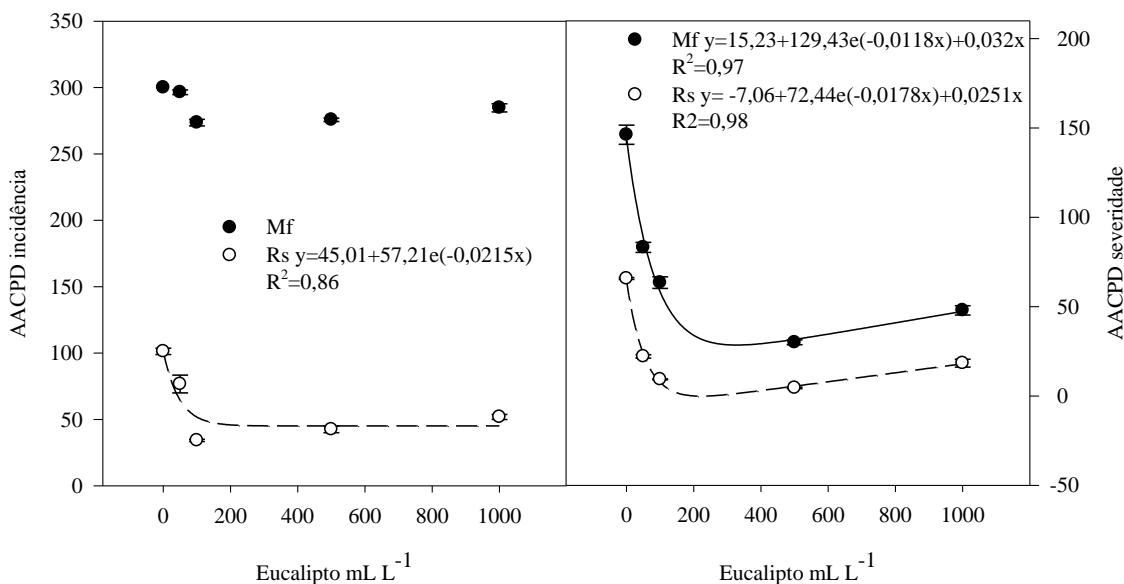
Tabela 19 – Composto químico, índice de Kovats, área relativa e classificação molecular dos componentes do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*), determinados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

Composto	IK	Área relativa (%)	Classe molecular
citronelal	1153	80,34	Monoterpenoide
isopulegol	1149	8,16	Monoterpeno
citronelol	1225	7,59	Monoterpeno
trans-β-cariofileno	1419	0,98	Sesquiterpeno
eucaliptol	1031	0,7	Monoterpenoide
acetato de citronelol	1352	0,52	Monoterpeno
β-pineno	979	0,52	Monoterpeno
neoiso-isopulegol	1171	0,4	Monoterpeno
α-pineno	939	0,21	Monoterpeno
linalol	1098	0,2	Monoterpeno

IK: Índice Kovats, coluna HP-5. Fonte: produção do próprio autor, 2017.

A AACPDi da podridão-parda não sofreu alteração com a aplicação do óleo de eucalipto, no entanto houve redução para a AACPDi da podridão-mole (Figura 5). Para a AACPDs a aplicação do óleo essencial de eucalipto (500 µL L⁻¹) reduziu em 79,5% para podridão-parda e 93,1% para a mole (Figura 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Lee et al. (2007), que também observaram controle de *Botrytis cinerea* com óleo essencial de *C. citriodora* aplicado via fumigação. Santos, Bulhões e Bonaldo (2016) encontraram redução da AACPDs de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em plantas de algodão tratadas com *C. citriodora* a 1%. Os autores associaram o menor desenvolvimento da doença com a indução de resistência causada pelo óleo. Mazzaro at al. (2008) também encontraram efeito indutor em cotilédones de soja com a aplicação do óleo essencial de *Eugenia uniflora*, planta pertencente à mesma família que *C. citriodora*.

Figura 5 – Área abaixo da curva de progresso da doença da incidência e da severidade de *Monilinia fructicola* (*Mf*) e de *Rhizopus stolonifer* (*Rs*), em pêssegos ‘Chimarrita’, após 30 dias de armazenagem ($0\pm0,2$ °C/UR de $95\pm2\%$) na presença de óleo essencial de eucalipto nas doses de 0, 50, 100, 500 e $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$, seguidos por mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de $60\pm5\%$).



Barras verticais correspondem o erro padrão da média. R^2 : coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

O efeito do óleo essencial de eucalipto citriodora *in vivo* também pode ser observado na produção e viabilidade de esporos, sendo que a dose de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ reduziu 68% da produção de esporos de *M. fructicola* e na dose de $500 \mu\text{L L}^{-1}$ houve inibição da produção de esporos (Tabela 20). Para o patógeno *R. stolonifer*, a dose de $50 \mu\text{L L}^{-1}$ diminuiu, em relação ao controle, 84% da produção de esporo, havendo inibição na dose de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 20). Nas doses em que houve produção de esporo não se observou redução de viabilidade para os dois patógenos (Tabela 20). Tanto a produção de esporos quanto a viabilidade, para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, apresentaram redução com o aumento da dose de óleo essencial fumigada (Tabela 12). A aplicação do óleo pode ter desencadeado o processo de indução de resistência ativando enzimas relacionadas a patogênese e fitoalexinas, aumentando a capacidade de defesa do fruto e dificultando o desenvolvimento dos patógenos, conforme observado em plantas de algodão por Santos, Bulhões e Bonaldo (2016).

A aplicação de óleo essencial de eucalipto citriodora controlou totalmente o crescimento *in vitro* de *M. fructicola* na dose de $100 \mu\text{L L}^{-1}$ e *R. stolonifer* na dose de $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ (Figura 6). A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) estimada foi de $1,02$ e de $60,1 \mu\text{L L}^{-1}$ para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, sendo a CI_{50} do patógeno *R. stolonifer* 5.892% maior

que a de *M. fructicola* (Tabela 21). Houve também a inibição completa da germinação de esporos dos dois patógenos na dose de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ e a sua produção na dose de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, sendo a inibição a 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ em relação ao controle de 82,4% e 48,3% para *M. fructicola* e *R. stolonifer* (Tabela 22). De maneira semelhante, Lee et al. (2007), em ensaios *in vivo*, encontraram diferenças no percentual de controle de diferentes patógenos com o tratamento de óleo essencial de eucalipto citriodora, sendo o crescimento micelial dos patógenos *B. cinerea* e *Fusarium oxysporum* reduzido, respectivamente, em aproximadamente 90% e 35% na dose de 23 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Tabela 20 – Produção (nº de esporos cm^{-2}) e viabilidade de esporos (%) em pêssegos 'Chimarrita' inoculados com *Monilinia fructicola* e *Rhizopus stolonifer*, submetidos à aplicação pós-colheita do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, após 30 dias de armazenamento ($0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ /UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ /UR de 60±5%).

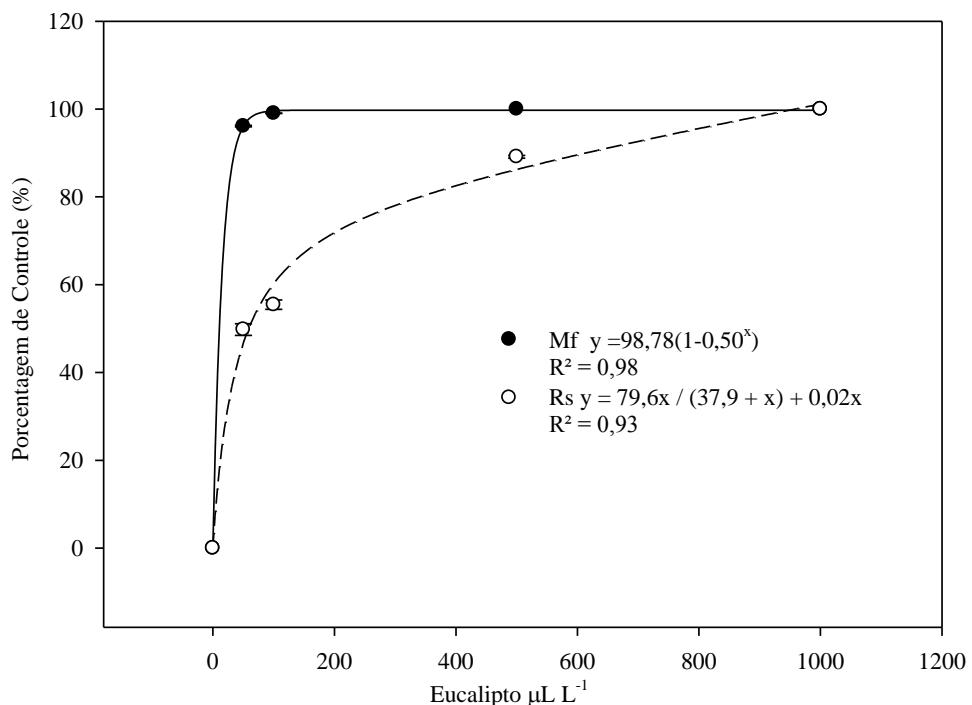
Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos cm^{-2} (10^7)	Viabilidade (%)	Esporos cm^{-2} (10^6)	Viabilidade (%)
Controle	188,3	93,8	191,5	75,2
50 $\mu\text{L L}^{-1}$	95,2	95,8	30,9	74,4
100 $\mu\text{L L}^{-1}$	59,8	94,9	0	0
500 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
<i>Linear</i>	***	***	***	***
<i>Quadrático</i>	***	***	***	***
C.V. (%)	6,6	5,1	9,6	9,8

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ***, ns: significativo a 0,1 % de probabilidade e não significativo a 5 % de probabilidade de erro, respectivamente. Fonte: elaboração do próprio autor.

Não houve resposta ao incremento das doses do óleo essencial de eucalipto para firmeza de polpa, acidez titulável, sólidos solúveis, cor da epiderme, taxa respiratória e de produção de etileno (Tabela 23). No entanto, foi observado dano fisiológico causado pela dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, caracterizado pelo amolecimento da polpa e aparente perda de suculência. Na dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ a firmeza de polpa e a acidez titulável foram 73% e 48% menores, respectivamente, em relação ao controle. A taxa respiratória e a de produção de etileno aumentaram 110% e 59%, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 23). A perda de firmeza pode estar associada ao dano fisiológico causado pela dose de 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, podendo os componentes da parede celular terem sido decompostos. O aumento da atividade metabólica, evidenciado pelo incremento nas taxas respiratória e de produção de etileno, pode ter sido desencadeado pelo

processo do dano fisiológico, e a menor acidez titulável ser reflexo da maior atividade respiratória, uma vez que os ácidos orgânicos são substratos da respiração celular. Castillo et al. (2014) também encontraram controle de podridões pós-colheita em limão, trabalhando com aplicação dos compostos de óleos essenciais carvacrol e timol associados a cera. No entanto, os autores além de controlarem as podridões estudadas também encontraram, diferentemente do presente trabalho melhor manutenção da qualidade dos frutos tratados com cera e óleos do que os frutos tratados somente com cera.

Figura 6 – Porcentagem de controle (%), *in vitro*, com base na AACPD da severidade de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, isolados em meio BDA, após 15 e 9 dias, respectivamente, de incubação a 25 °C com o óleo essencial de eucalipto fumigado nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 µL L⁻¹, submetidos à análise de regressão.



Barras verticais correspondem ao erro padrão da média. R²: coeficiente de determinação. Fonte: elaboração do próprio autor.

Tabela 21 – Estimativas da concentração inibitória de 50% (CI₅₀), *in vitro*, equações de regressão e coeficiente de determinação (R^2) do óleo essencial de eucalipto para porcentagem de crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, determinados nas concentrações de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Patógeno	CI ₅₀	Equação	R^2
<i>Monilinia fructicola</i>	1,02	y=98,78(1-0,50 ^x)	0,98
<i>Rhizopus stolonifer</i>	60,1	y = 96,95(1-0,287 ^x)-0,134	0,93

Fonte: elaboração do próprio autor.

Tabela 22 – Produção (10^6 mL^{-1}) e viabilidade de esporos (%) de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*, 48h após o estímulo da germinação, em meio ágar-água, oriundos de colônias com 15 e 9 dias de idade para *M. fructicola* e *R. stolonifer*, respectivamente, incubados à 25 °C e submetidos à aplicação por fumigação do óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) nas doses de 0, 50, 100, 500, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Dose	<i>Monilinia fructicola</i>		<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	Esporos mL^{-1} (10^6)	Viabilidade (%)	Esporos mL^{-1} (10^6)	Viabilidade (%)
Controle	101,3	97,5	56,3	92,8
50 $\mu\text{L L}^{-1}$	17,8	0	29,1	0
100 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
500 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$	0	0	0	0
<i>Linear</i>	***	***	***	***
<i>Quadrático</i>	***	***	***	***
C.V. (%)	51,3	6,4	27,1	39,1

Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ***, significativo a 0,1 %; ** significativo a 1 % de probabilidade de erro. Fonte: elaboração do próprio autor.

Tabela 23 – Firmeza de polpa (N), acidez titulável (meq 100 mL^{-1}), sólidos solúveis (°Brix), ângulo hue, respiração ($\text{mL CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e produção de etileno ($\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em pêssegos 'Chimarrita', não inoculados, submetidos à aplicação pós-colheita por fumigação de óleo essencial de eucalipto (*Corymbia citriodora*) nas doses de 0, 50, 100, 500 e 1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$, após 30 dias de armazenamento (0 ± 1 °C/UR de 95±2%) mais 4 dias em condições ambiente (20 ± 2 °C/UR de 60±5%).

Concentração	Firmeza	Acidez	Sólidos	hue°	Respiração	Produção
Controle	19,1	2,7	13,4	101,6	20,6	22,3
50 $\mu\text{L L}^{-1}$	22,1	2,7	13,1	99,9	19,3	21,3
100 $\mu\text{L L}^{-1}$	21,7	2,3	13,4	98,2	19,8	19,8
500 $\mu\text{L L}^{-1}$	22,0	2,4	13,7	97,7	20,8	22,0
1.000 $\mu\text{L L}^{-1}$	5,1*	1,4*	13,2	103,0	43,3*	35,5*
<i>Linear</i>	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
<i>Quadrático</i>	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	10,84	20,3	9,6	4,4	27,9	20,4

*: diferente do tratamento controle pelo teste de Dunnet ($\alpha = 0,05$); Dados submetidos a análise de contrastes ortogonais polinomiais. ns: não significativo a 5 % de probabilidade de erro.

3.5 CONCLUSÕES

A fumigação dos óleos essenciais de citronela, tangerina e eucalipto citriodora diminui o desenvolvimento *in vitro* de *R. stolonifer* e *M. fructicola* e das podridões causadas por estes patógenos em pêssegos ‘Chimarrita’ armazenados.

Os óleos essenciais reduzem a produção e a viabilidade de esporos de *Monilinia fructicola* e de *Rhizopus stolonifer*.

A dose de 1.000 µL L⁻¹ dos óleos de citronela e de eucalipto citriodora causa dano fisiológico em pêssegos ‘Chimarrita’ armazenados, prejudicando a sua qualidade.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a indução de resistência pelas aplicações em pré-colheita de ASM, mananoligossacarídeo fosforilado de *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana. Os indutores de resistência alteraram o metabolismo secundário dos frutos aumentando sua capacidade de defesa com a síntese de proteínas relacionada a patogênese como a quitinase. Os tratamentos ASM (60 mg L^{-1}), *S. cerevisiae*, *B. subtilis* e quitosana reduziram o desenvolvimento da podridão-parda e da podridão-mole. Alguns elicidores, além de induzir a resistência controlaram o crescimento *in vitro* dos patógenos como por exemplo o *Bacillus subtilis*. Não houve nenhuma alteração dos atributos de qualidade nos frutos tratados com os elicidores.

A aplicação dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), tangerina (*Citrus reticulata*) e eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*) em pós-colheita via fumigaçāo tem potencial para diminuir o desenvolvimento de *M. fructicola* e *R. stolonifer* *in vivo* e *in vitro*. A dose de $1.000 \mu\text{L L}^{-1}$ dos óleos de citronela e de eucalipto citriodora causa dano fisiológico em pêssimos ‘Chimarrita’.

Futuros trabalhos devem ser desenvolvidos com os elicidores para definir a época de aplicāção adequada, intervalos entre aplicações e a possível interferência sob outros atributos fitotécnicos como a produção total e a incidência de outras doenças.

Para os óleos essenciais, estudos adicionais poderiam ser delineados com o objetivo de determinar qual o período de aplicāção mais eficientes, identificar quais componentes dos óleos tem ação sob os fungos e a interferência desses nas propriedades organolépticas dos frutos.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 5° ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALIZADEH H.; BEHBOUDI K.; AHMADZADEH M.; JAVAN-NIKKHAH M.; ZAMIOUDIS C.; PIETERSE C.M.J.; BAKKER P.A.H.M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. **Biological Control**, v.65, n.1, p14-23, 2013.
- ANDRADE, E.R. Doenças do pêssego e da ameixa e seu controle no estado de Santa Catarina. Florianópolis: EPAGRI, 52p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 71), 1995.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana, **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.
- ASGHARI M.A.; MOSTOFI Y.; SHOEIBI S.; FATTAH M. Effect of cumin essential oil on postharvest decay and some quality factors of strawberry, **Journal of Medicinal Plant**, v.8, n.31, 2009.
- AUBEL, G.; CAMBIER, P.; DIEU, M.; CUTSEM, P.V. Plant immunity induced by COS-OGA elicitor is a cumulative process that involves salicylic acid. **Plant Science**, v.247, p. 60-70, 2016.
- AMORIM, L.; MARTINS, M. C.; LOURENÇO, S. A.; GUTIERREZ, A. S. D.; ABREU, F. M.; GONÇALVES, F. P. Stone fruit injuries and damage at the wholesale market of São Paulo, Brazil, **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 353-357, 2008.
- AZERÊDO, L.P.M.; SILVA, S.M.; LIMA, M.A.C.; DANTAS, R.L.; PEREIRA, W.E. Qualidade de manga ‘Tommy Atkins’ da produção integrada recoberta com fécula de mandioca associada a óleos essenciais e quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.38, n. 1, p. 141-150, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BANKS, N.H.; CLELAND, D.J.; CAMERON, A.C.; BEAUDRY, R.M.; KADEL, A.A. Proposal for a rationalized system of units for postharvest research in gas exchange. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.30, p.1129-1131, 1995.
- BARILLI, E.; MORAL, A.; SILLERO, J.C.; RUBIALES, D. Clarification on rust species potentially infecting pea (*Pisum sativum* L.) crop and host range of *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. **Crop Protection**, v.37, p.65-70, 2012.
- BERTINI, L.; LEONARDI, L.; CAPORALE, C.; TUCCI, M.; CASCONE, N.; BERARDINO, I.D.; BUONOCORE, V.; CARUSO, C. Pathogen-responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding. **Plant Science**, v.164, n.6, p.1067-1078, 2003.

BOAVA, L.P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.I.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.168-172, 2010.

BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 128-134, 2004.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. p.11-28, 2005.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, n.2, p.99-109, 1999.

BOSTOCK, R.M.; KARBAN, R.; THALER, J.S.; WEYMAN, P.D.; GILCHRIST, D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.103-111, 2001.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.545-580, 2005.

BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-Smethyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, v.152, n.1, p.34-42, 2004.

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

CASTILLO, S.; PÉREZ-ALFONSO, C.O.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. **Food Control**, v.35, n.1, p. 132-136, 2014.

CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A.; LEAL, T.C.A.B.; SOUZA, C.M.; NAZARENO, A.C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.4, p.55-61, 2007.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.81-124.

CHAVAN, P.S.; TUPE, SG. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115-120, 2014.

CHEN L.H.; HAN R.; ZHANG H.; XU X.H.; SHAO H.B.; WANG M.Y.; CHENG Y.; SHAO X.H.; Irrigating-continuous cropping with *Bacillus subtilis* D9 fortified waste water could control the Fusarium wilt of *Artemisia selengensis*. **Applied Soil Ecology**, v. 113 n.1, p.127-134, 2017.

CHESTER K.S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly review of biology**, v.8 p.275-324, 1933.

CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J. & MAUCH-MANI, B. Priming in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v.7, n. 5, p.210-216. 2002.

COSTA, J.B.C.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO, P.M.R.J.; CAMILO, F.R.; MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 285-294, 2010.

CRUICKSHANK, I.A.M.; MANDRIK, A. The effect of stem infestations of tobacco with *Perenospora tabacina* Adam on foliage reaction to blue mold. **Jornal of Australian Agricultural Science**, v.26, p.369-372, 1960.

DANN, E.K.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.P; DEVERALL, B.J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.5, p.307-319, 1996.

DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COÊLHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 3, p. 314-319, 2004.

DE MORAES, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

DI PIERO, R. M; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, , v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERREIRA, L.R.L.; ARIEIRA, J.O.; MIGUEL, E.G.; DONEGA, M.A.; RIBEIRO, R.C.R. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3., p.228-232, 2010.

DROBY, S.; EICK, A.; MACARISIN, D.; COHEN, L.; RAFAEL, G.; STANGE, R., MCCOLUM, G.; DUDAI, N.; NASSERA, A.; WISNIEWSKI, M.; SHAPIRA, R. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 386–396,2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitycal Biochemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 185–209, 2004.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Statistics Division. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

FAJARDO J.E.; McCOLLUM, T.G.; McDONALD, R.E.; MAYER, R.T. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. **Biological Control**, v.13, n.3, p.143-151, 1998.

FARIAS-SILVA, C.E.; Gama, B.M.V.; Oliveira, L.M.T.M.; Araujo, L.T.; ARAUJO, M.L.; OLIVEIRA-JUNIOR, A.M.; ABUD, A.K.S. Uso da laranja lima e seus resíduos no desenvolvimento de novos produtos. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.10, n.1, p.69-96, 2016.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128p.

FIEDLER, S.; HEERKLOTZ, H. Vesicle leakage reflects the target selectivity of antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 10, p. 2079-2089, 2015.

FORTES, J. F. Principais doenças. In: RASEIRA, M. DO C. B.; CENTELLAS-QUESADA, A. (Ed.). **Pêssego: produção**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.107-114 (Frutas do Brasil, 49), 2003.

GE, Y.; DENG, H.; BI, Y.; LI, C.; LIU, Y.; DONG, B. Postharvest ASM dipping and DPI pre-treatment regulated reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, n..1, p. 160-167, 2015.

GILARDI, G.; DEMARCHI, S.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Evaluation of the short term effect of nursery treatments with phosphite-based products, acibenzolar-S-methyl, pelleted *Brassica carinata* and biocontrol agents, against lettuce and cultivated rocket fusarium wilt under artificial inoculation and greenhouse conditions. **Crop Protection**. v.85, p.23-32, 2016.

GOUVEA, A.; KUHN O.J.; MAZARO S.M.; MIO L.L.M.; DESCHAMPS C.; BIASI L.A.; FONSECA V.C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do moranguero tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 527-533, 2009.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, F.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, U.; BECKHOVE, K.; KOGL, M.; OOSTENDORP, T.; STAUB, E.; WARD, H.; KESSMANN, J.; RYALS. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**. v.8, p.629–643,1996.

GUO, J.; FANG, W.; LU, H.; ZHU R.; LU, L.; ZHENG, X.; YU, T. Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast *Cryptococcus laurentii*. **Postharvest Biology and Technology**, v.88, p.72-78, 2014.

GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v.19, n.3, p.241-247, 2009.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopatology**, v.144, p.449-454, 1996.

HOSNI, K.; ZAHED, N.; CHRIF, R.; ABID, I.; MEDFEI, W.; KALLEL, M.; BRAHIM, N.B.; SEBEI, H. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. **Food Chemistry**, v. 123, p.1098-1104, 2010.

HUSSEIN, H.; SALEM M.Z.M; SOLIMAN, A.M. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*. **Scientia Horticulturae**, v. 216, n. 1, p. 11-119, 2017

KAPOVISSI, S.; BERO, J., AGBANI, P.; GBAGUIDI, F.; KPAGONOU-KAPOVISSI, B.; SINSIN, B.; ACCRONBESSI, G.; FREDERICH, M.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmoidal activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

KIMATI, I.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v.2, 651p., 2005.

KONG, M. CHEN, X.G; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KOVALESKI, A.; GIRARDI, C.; BONETI, J.I.S. ; PALLADINI, L.A.; RIBEIRO, L.G.; BERTON, O.; KRÜGER, R.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.F.; KATSURAYAMA, Y. **Produção integrada de maças no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho, 2003.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.7-12, 2001.

KUNDU, A.; SAHA, S.; WALIA, S.; KOUR, C. Antioxidant and antifungal properties of the essential oil of *Anisomeles indica* from India. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 24, p.1774-1779, 2013.

LARENA, I., TORRES, R., DE CAL, A., LINAN, M., MELGAREJO, P., DOMENICHINI, P., BELLINI, A., MANDRIN, J.F., LICHOU, J., OCHOA DE ERIBE, X., USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, v. 32, n.1, p.305-310, 2005

LEE, S.O.; CHOI, G.J.; JANG, K.S.; LIM, H.K.; CHO, K.Y.; KIM, J. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soil borne plant pathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, v.23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LORENZETTI, E.R. MONTEIRO, F.P.; SOUZA, P.E.; SOUZA, R.J.; SCALICE, H.K.; DIOGO JR, R.J.; PIRES, M.S.O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de moranguero. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n. especial, p.619-627, 2011.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 300-306, 2007.

LOU, M.M.; ZHU, B.; MUHAMMAD I.; LI, B.; XIE, G.L.; WANG, Y.L.; LI, H.Y.; SUN, G.C. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 11, p. 1294-1301, 2011.

LOUWS, F.J., WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; JONES, J.B.; SHOEMAKER, P.B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481–488, 2001.

LU, H. LU, L.; ZENG, L.; FU, D.; XIANG, H.; YU, T.; ZHENG, X. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodosporidium paludigenum* against *Penicillium expansum* in apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 92, n. 1, p. 9-15, 2014.

LUZZATTO-KNAAN, T.; KEREM, Z.; LIPSKY, A.; YEDIDIA, I. A systemic response of geophytes is demonstrated by patterns of protein expression and the accumulation of signal molecules in *Zantedeschia aethiopica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, V.71, p.218-225, 2013.

MARČETIĆ, M.; KOCAČEVIĆ, N.; LAKUŠIĆ, D.; LAKUŠIĆ, B. Habitat-related variation in composition of the essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae), **Phytochemistry**, v.135, p.1-13, 2016.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G.C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 5, p. 761-766, 2003.

MARTINS, M. C.; AMORIM, L. Doenças das rosáceas de caroço. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 228, p. 44-48, 2005.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, v.23, p.1091-1101, 1972.

MAY-DE MIO L.L.; GARRIDO L.; UENO B. Doenças de fruteiras de caroço. In: Monteiro, LB, May-De Mio LL, Serrat BM, Motta AC, Cuquel FL (Eds.) **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba pp. 169-221, 2004.

MAY-DE MIO L.L; MOREIRA L.M.; MONTEIRO L.B.; JUSTINIANO JÚNIOR P.R. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p.227-234, 2008.

MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; MAY-DE-MIO, L.L.; BIASI L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K. Comportamento pós-colheita de frutos de moranguero após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

MAZARO, S.M.; GOUVEA, A.; JUNIOR, A.W.; CITADIN, I. Enzimas associadas à indução de resistência em moranguero pelo uso de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n.1, p. 91-99, 2012.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R.T.; MAGNO, R.G.JR.; LOPES, E.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.1, p. 83-90, 2007.

MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 237-243, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MOHAMMADI S.; AMINIFARD M.H. Effect of essential oils on postharvest decay and some quality factors of peach (*Prunus persica* var. Redhaven). **Journal of Biology and Environment Science**, v.6, n.17, p.147-153, 2012.

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

MORRIS, S.W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRETT, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C.C.; FREDERIKSEN, C.A.; BHANDHUFALCK, B.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.7, p.643–658, 1998.

MOSCOSO-RAMÍREZ, P.A.; PALOU, L. Evaluation of postharvest treatments with chemical resistance inducers to control green and blue molds on orange fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.85, p.132-135, 2013.

NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.67, n.2, p.149–156, 2013.

NALLY, M.C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; MUÑOZ, C.J.; COMBINA, M.; TORO, M.E.; CASTELLANOS-DE-FIGUEROA, L.I.; VAZQUEZ, F. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology and Technology**, v.64, n.1, p.40-48, 2012.

NGUGI, H.K.; DEDEJ, S.; DELAPLANE, K.S.; SAVELLE, A.T.; SCHERM, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, n.1, p.32-38, 2005.

NIELSEN, K.K.; BOJSEN, K.; COLLINGE, D.B.; MIKKELSEN, J.D. Induced resistance in sugar beet against *Cercospora beticola*: induction by dichloroisonicotinic acid is independent of chitinase and β -1,3-glucanase transcript accumulation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.45, n.2, p.89-99, 1994.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI R.H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p.549-553, 2010.

OLIVEIRA, C.E. MAGNANI, M.; SALES, C.V.; PONTES, A.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.C.; SOUZA, E.L. Effects of post-harvest treatment using chitosan from *Mucor circinelloides* on fungal pathogenicity and quality of table grapes during storage. **Food Microbiology**, n. 44, n. 1, p. 211–219, 2014.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, cap.22, p.417-454, 1995.

PAVANELLO, E.P.; BRACKMANN, A.; THEWES, F.R.; VENTURINI, T.L.; WEBER, A.; BLUME, E. Postharvest biological control of brown rot in peaches after cold storage preceded by preharvest chemical control. **Ceres**, v. 62, n. 6, p. 539-545, 2015. (a)

PAVANELLO, E.P.; BRACKMANN, A.; THEWES, F.R.; BOTH, V.; SANTOS, J.R.A.; SCHORR, M.R.W. Eficiência de fungicidas no controle da podridão parda do pêssego e sua relação com parâmetros fisiológicos dos frutos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 67-76, 2015. (b)

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; PERINA, F. J.; RIBEIRO, P.M.JR.; ALVES, E. Citronella essential oil in the control and activation of coffee plants defense response against rust and brown eyespot. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 383-390, 2012.

PHILLIPS, C.A.; LAIRD, K.; ALLEN, S.C. The use of Citri-VTM® — An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 310-314, 2012.

PICHERSKY, E.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v.311, n. 5762, p.808–811, 2006.

PROFOTOVÁ, B.; BURKETOVÁ, L.; NOVOTNÁ, Z.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O. Involvement of phospholipases C and D in early response to SAR and ISR inducers in *Brassica napus* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.44, n.2–3, p.143-151, 2006.

RAMENAZI, H.; SINGH, H.P.; BATISH, D.R., KOHLI, R.K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, v.73, p. 261-262, 2002.

REGNIER, T.; COMBRINCK, S.; VELDMAN, W.; DU-PLOOY, W. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p.151-159, 2014.

REUVENI, R.; DOR, G.; RAVIV, M.; REUVENI, M.; TUZUN S. Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**. v.19, n.5, p.355-361, 2000.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

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

ROMERO, A.M., KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**. v.85, p.189–194, 2001.

RIBEIRO, F.W.M.; LAURENTINO, L.S.; ALVES, C.R.; BASTOS, M.S.R.; COSTA, J.M.C.; CANUTO, K.M.; FURTADO, R.F. Chemical modification of gum arabic and its application in the encapsulation of *Cymbopogon citratus* essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 8, p. 41519-41525, 2015.

SANTOS, A.; SÁNCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v. 159, n. 4, p. 331-338, 2004.

SANTOS, B.T.; BULHÕES, C.C.; BONALDO, S.M. Inducing resistance in cotton against *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* with essential oils. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 5, p. 45-50, 2016

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.97, n.21, p.11655-11660, 2000.

SIEGRIST, L.; GLENEWINKEL, D.; KOLLE, C.; SCHMIDTKE, M. Chemical induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection** v. 104, n. 6, p. 559-610, 1997.

SILVA, R.F., PASCHOLATI, S.F. & BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n.3, p. 189-196, 2007.

SIMAS, D.L.R., DE AMORIM, S.H.B.M., GOULART, F.R.V.; ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., SILVA, A.J.R. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 98, n. 1, 108-115.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUUMANIS, K.; FASSEAS, K.; & NYCHAS, G. J. E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *E. coli* 0157:H7. **Italian Journal of Food Science**, v. 13, p. 55-65, 2001.

SUM, X.; NARCISO, J.; WANG, Z.; FERENCE, C.; BAI, J.; ZHOU, K. Effects of Chitosan-Essential Oil Coatings on Safety and Quality of Fresh Blueberries. **Journal of Food Science**, Chicago v. 79, n. 5, p. 955-960, 2014.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C.; LIMA, G.P.P. Ineficiência de acibenzolar-S-metil na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 373-377, 2004.

SON, J.; SUMAYO, M.; HWANG, Y.; KIM, B.; GHIM, S. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v.73, p.1-8, 2014.

STELLA, F.P.; STEFFENS, C.A.; AMARANTE, C.V.T.; MARTIN, M.S. Maturação, amadurecimento de frutos e controle de podridões de *Penicillium* spp. em maçãs ‘Fuji’ com a aplicação pré-colheita de indutores de resistência. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2013.

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

SVIRCEV, A.M.; SMITH, R.J.; ZHOUC, T.; HERNADEZ, M.; LIU, W.; CHU, C.L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 228–233, 2007.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, n.1, p. 265-271, 2014.

TAVARES, G.M.; LARANJEIRA, D.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, T.R.; PIROVANI, C.P.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1416-1423, 2009.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.1-13, 2004.

TERRY, L.A.; JOYCE, D.C. Elicitors of induced disease resistance in posharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technoly**, Amsterdam, v.32, p.1-13, 2004

- TOFFANO, L.; FIALHO, M.B.; PASCHOLATI, S.F. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**, v. 108, n.1, p. 77-82, 2017.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p. 68-71, 2006.
- VAN-LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135-62, 2006.
- VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPA, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v.21, n.1, p.1-10, 2002.
- VITORATOS, A.; BILALIS, B.; KARKANIS, A.; EFTHIMIADOU, A. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 41, n. 1, p. 86-92, 2013
- WANG, H.; MA, H.; SONG, L.; SHU, Y.; GU, W. Effect of Shatangju (*Citrus reticulate* Blanco) essential oil on spore germinationand mycelium growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 5, p. 715–723, 2012.
- WANG, H.; TAO, N.; HUANG, H.; LIU, H. Effect of shatangju (*Citrus reticulata* Blanco) essential oil on spore germination and mycelium growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 5, p. 715-723, 2013.
- WANG, H.; TAO, N. G.; HUANG, S. R.; LIU, Y. J. Effect of Shatangju (*Citrus reticulata* Blanco) essential oil on spore germination and mycelium growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, n. 5, p. 715–723, 2012.
- WANG, X.; WANG, J.; JIN,P.; ZHENG, Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n.1, p.141-147, 2013.
- WILSON, C.L.; EL GHIAOUTH, A.; CHALUTZ, E.; DROBY, S.; STEVENS, C.; LU, J.Y.; KHAN, V.; ARUAL, J. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plant diseases**, v. 78, n. 9, p. 837-844, 1994.
- WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v.322, p. 681–692, 1997.
- ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, n.2, p.195-202, 1997.
- ZHANG, D.; QUANTICK, P.C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.73, p.763–767, 1998.

ZHANG, D; WANG, H.; LIU, Y. Chitosan controls postharvest decay on cherry tomato fruit possibly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 33, p. 7399-7404, 2015.