

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

JORGE PORTELLA BEZERRA

**ANTRACNOSE EM MELOEIRO (*Cucumis melo* L.): CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE *Colletotrichum brevisporum* E
CONTROLE UTILIZANDO COMPOSTOS À BASE DE SILÍCIO**

Rio Largo

2015

JORGE PORTELLA BEZERRA

**ANTRACNOSE EM MELOEIRO (*Cucumis melo* L.): CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE *Colletotrichum brevisporum* E
CONTROLE UTILIZANDO COMPOSTOS À BASE DE SILÍCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas, como requisito para
obtenção do título de doutor.

Orientador: Dr. Paulo Vanderlei Ferreira

Coorientador: Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Rio Largo

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

JORGE PORTELLA BEZERRA

**ANTRACNOSE EM MELOEIRO (*Cucumis melo* L.): CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE *Colletotrichum brevisporum* E
CONTROLE UTILIZANDO COMPOSTOS À BASE DE SILÍCIO**

**Tese submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas
da Universidade Federal de Alagoas e aprovada
no dia 30 de abril de 2015.**

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Ferreira, CECA/UFAL (Orientador)

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. Juliana Paiva Carnaúba Ramos, IFAL/Campus Murici (Examinadora
Externa)**

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, CECA/UFAL (Examinador Interno)

**Dr. Roberto Ramos Sobrinho, PNP/Institucional/CECA/UFAL (Examinador
Interno)**

Dedico este trabalho aos meus filhos, Tatiana e Marco Antônio, aos meus pais, Jurandy e Dirce e à minha esposa Suzana.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Suzana, pelo apoio inestimável durante a condução deste trabalho.

Aos meus pais, Jurandy e Dirce, pelo apoio e incentivo durante a condução deste trabalho e em toda a minha vida.

Ao meu filho, Marco Antônio, pelo apoio e incentivo durante a condução deste trabalho.

Ao meu Orientador, Dr. Paulo Vanderlei, pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao meu Coorientador, Dr. Gaus Andrade, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela orientação.

À Dra. Iraíldes Assunção pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu Laboratório.

Ao Dr. Leonardo Barbosa pelos muitos ensinamentos recebidos e pelo convívio enriquecedor.

Ao Dr. Roberto Ramos pelo compartilhamento de seu conhecimento em Fitopatologia.

Ao Dr. Ailton Reis pela cessão dos isolados de fungos utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira pelo apoio e incentivo ao longo da minha carreira.

Ao colega Lucas Fonseca pelo apoio na condução deste trabalho.

Ao colega Renato Nascimento pelo bom convívio e pelo apoio na montagem de experimentos.

À Dra. Edna Peixoto pelos ensinamentos e pela cessão de reagentes.

À colega Jaqueline Figueredo, pelo apoio e por compartilhar comigo os seus conhecimentos em Fitopatologia.

Ao colega Frederico Feijó pelos ensinamentos em Fitopatologia e pelo bom convívio.

Ao colega Livoney Goes por compartilhar comigo os seus conhecimentos em enzimologia.

À Dra. Maria de Fátima Muniz pelo apoio e pelas boas sugestões a cerca do meu trabalho.

À Isabella Cardoso pelo inestimável apoio nos ensaios de atividade enzimática.

À colega Maria Quitéria Cardoso pelo compartilhamento dos seus conhecimentos em cinética enzimática.

Ao colega Jadilson Macedo pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Júlio Cardoso pelas boas sugestões e pela cessão de reagente.

Ao Dr. Gildemberg Leal pelos ensinamentos e pelas boas sugestões a cerca do trabalho.

Ao Dr. Laurício Endres pela cessão do seu Laboratório, equipamentos e reagentes para a realização dos ensaios enzimáticos.

À Dra. Sonia Broglio pelos ensinamentos recebidos.

Aos todos os Professores do Curso de Proteção de Plantas pelos conhecimentos adquiridos.

Aos colegas, Hully Monaísy, Josiane, Deise, Danilo, Ellen, Vanessa pelo bom convívio ao longo deste doutorado.

A todos os pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Virologia e Fitopatologia Molecular pelo bom convívio e o apoio durante a realização deste trabalho.

À Lauristela da Silva pelos prestimosos trabalhos técnicos no Laboratório de Virologia e Fitopatologia Molecular.

Aos secretários da Pós-Graduação, Geraldo, Marcos, Michele e Maxuel pelo dedicado trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram positivamente para a execução deste trabalho e que, por esquecimento meu, não foram aqui citadas.

**“Aprende de teus maus julgamentos os teus
bons julgamentos.” Reb Zalman**

RESUMO

O melão (*Cucumis melo* L.) está entre as 20 principais hortaliças cultivadas no mundo, sendo uma importante cultura no mercado interno e no de exportação. Ainda que a Região Nordeste seja a maior produtora do fruto no Brasil, o Estado de Alagoas apresenta uma pequena produção desta hortaliça, porém, existe um grande potencial para a produção de melões, considerando-se a grande porção do Estado inserida no Semiárido e banhada pelo Rio São Francisco e, portanto, passível de irrigação. Doenças da pós-colheita são responsáveis por perdas, que variam entre 20 e 80%. A antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., é uma importante doença que ataca a cultura do meloeiro. Para controlar essas e outras doenças na pós-colheita, tem-se buscado métodos alternativos com compostos à base de silício como alternativa ao uso de fungicidas sintéticos. Com o objetivo de contribuir para a redução do uso de pesticidas, foram testados, neste trabalho, o emprego de silicato de sódio (NaSiO_3) e dióxido de silício (SiO_2), nas concentrações de 100 e 200 mM, no controle de antracnose em melão cv Acclaim. Para tal, primeiramente, um isolado de *Colletotrichum* sp. causador de antracnose em cucurbitácea, proveniente da Embrapa Hortaliças/DF, teve a sua patogenicidade testada para frutos de melão da variedade Acclaim (Syngenta). Com o resultado sendo positivo, este foi caracterizado morfológica e molecularmente, com base nos marcadores genéticos actina (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), quitina sintetase (CHS I), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH) e espaçador interno transcrito do rDNA (ITS). A partir da análise filogenética foi possível caracterizar o isolado como pertencente à espécie *Colletotrichum brevisporum*, sendo o primeiro relato de sua ocorrência colonizando melão no Brasil. Para o controle da antracnose em frutos de meloeiro foi testada a ação de SiO_2 e a de NaSiO_3 sobre o patógeno, por métodos *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo *in vitro*, o crescimento micelial do patógeno foi medido em meio BDA, após a adição dos compostos NaSiO_3 e SiO_2 , nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mM, com medição do pH dos meios. Os testes *in vivo* foram realizados com as concentrações de 100 e 200mM, das duas fontes de silício. Observou-se que NaSiO_3 , nas concentrações de 100 e 200 mM, foi capaz de inibir o crescimento micelial do patógeno, *in vitro*, e que os pHs dos meios acrescidos de silicato de sódio subiram fortemente, atingindo valores de 12,36 (100 mM) e de 12,96 (200 mM). NaSiO_3 , a 200 mM, reduziu a severidade da doença em melões

Acclaim, em 37,12%. Portanto, neste trabalho ficou estabelecida uma relação patógeno-hospedeiro entre *Colletotrichum brevisporum* e *Cucumis melo*, sendo este o primeiro relato do patógeno colonizando esta cultura. Constatou-se que ocorreu a inativação do crescimento de *C. brevisporum*, pelo emprego de silicato de sódio, em concentrações acima de 100 mM, *in vitro*, e que ocorreu redução da severidade da antracnose em frutos de melão Acclaim. Aparentemente, a elevação do pH teve efeito direto sobre o patógeno, ao invés do silicato de sódio induzir resistência nos frutos.

Palavras-chave: Cucurbitáceas; Análise filogenética; *Colletotrichum brevisporum*; silicato de sódio; dióxido de silício.

ABSTRACT

The melon (*Cucumis melo* L.) is among the top 20 vegetables grown in the world, being an important crop in the domestic market and export. Although the Northeast is the largest producer of the fruit in Brazil, the state of Alagoas has a small production of this vegetable, however, there is great potential for the production of melons, considering the great state portion inserted into the semi-arid and bathed by São Francisco River and therefore liable to irrigation. Post-harvest diseases account for losses ranging between 20 and 80%. Anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., is an important disease that attacks the melon crop. To control these and other diseases in post-harvest, it has been thought alternative methods based on silicon compounds as an alternative to the use of synthetic fungicides. In order to contribute to reducing the use of pesticides, were tested, in this work, the use of sodium silicate (NaSiO_3) and silicon dioxide (SiO_2), at doses of 100 and 200 mM in anthracnose control in melon variety Acclaim. For this purpose, first, an isolated *Colletotrichum* sp. anthracnose-causing in cucurbit, from the Embrapa Vegetables/DF, had its pathogenicity tested for melon fruits of variety Acclaim (Syngenta). With the result being positive, the pathogen were characterized in morphological and molecular level, based on genetic markers actin (ACT), β -tubulin (TUB2), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS I), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and internal transcribed spacer rDNA (ITS). From the phylogenetic analysis it was possible to characterize the isolated as belonging to the species *Colletotrichum brevisporum*, being the first report of its occurrence colonizing melon in Brazil. For the control of anthracnose in melon fruit, it was tested the effect of SiO_2 and NaSiO_3 on the pathogen, by methods *in vitro* and *in vivo*. For the *in vitro* study, the mycelial growth of the pathogen on PDA medium was measured after addition of SiO_2 and NaSiO_3 compounds, at concentrations of 25, 50, 100 and 200 mM, included pH measurement. *In vivo* tests were carried out with concentrations of 100 and 200 mM, for the two sources of silicon. It was observed that NaSiO_3 , at concentrations of 100 and 200 mM, was capable of inhibiting the mycelial growth of the pathogen, *in vitro* conditions, and that the pH of the media plus sodium silicate rose sharply, reaching values of 12.36 (100 mM) and 12.96 (200 mM). NaSiO_3 , at 200 mM, reduced the severity of disease in Acclaim (Syngenta) melons, at 37.12%. Therefore, in this work it was established a host-pathogen relationship between *Colletotrichum*

brevisporum and *Cucumis melo*, which is the first report of this pathogen colonizing that culture. Therefore, it was found that *C. brevisporum* growth inactivation occurred by the use of sodium silicate in concentrations above 100 mM, *in vitro*, and that decrease in the severity of anthracnose in Acclaim melon fruit was observed. Apparently, pH elevation had a direct effect on the pathogen, rather than the sodium silicate induced resistance in fruits.

Keywords: Cucurbitaceae; Phylogenetic analysis; *Colletotrichum brevisporum*; sodium silicate; silicon dioxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Aspectos culturais e morfológicos de *Colletotrichum brevisporum*: Crescimento micelial em meio BDA sintético, após sete dias, visão superior (A) e reversa (B); conídios (C e D); e apressórios (E e F)..... 51
- Figura 2** - Curva de crescimento micelial de *Collethotrichum brevisporum* em meio BDA sintético. Os valores representam a média de cinco repetições..... 52
- Figura 3** - Árvore filogenética construída com parcimônia máxima utilizando análise combinada de seis marcadores genéticos (ITS, GADPH, TUB2, CHS-1, ACT e CAL). Utilizada para identificar *Colletotrichum brevisporum* (JP73). *C. boninense* funcionou como *outgroup*. Foi utilizado o método de máxima verossimilhança no programa RaxML, assumindo o modelo *general time reversible* (GTR) para substituição de nucleotídeos, com distribuição GAMMA da taxa de heterogeneidade..... 53
- Figura 4** - Testes de patogenicidade de *Colletotrichum brevisporum* em relação às cultivares comerciais, Acclaim (A), Valenciano (B), Orange Flesh (C), a em frutos do quarto ciclo de seleção massal da população PH1 do Programa de Seleção Genética do Meloeiro do CECA/UFAL, (D) e GrandPrix (E)..... 55

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Efeito de compostos de silício na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum brevisporum*, comparação por concentração. Na, silicato de sódio, e Si, dióxido de silício, nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mM. As médias com letras diferentes, para cada concentração indicam diferença significativa, pelo Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (dms=13,30)..... 67
- Figura 2** - Efeito de compostos de silício na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum brevisporum*. Na, silicato de sódio, e Si, dióxido de silício, nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mM; H₂O+T, água mais Tween 80. As médias seguidas da mesma letra do

Controle, em uma mesma coluna, não diferem entre si, conforme o Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (dms=13,30)..... 68

Figura 3 - Efeito de compostos de silício sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim. Na: silicato de sódio; Si: dióxido de silício. As médias representam os valores obtidos para duas concentrações (100 e 200 mM), para cada fonte de silício. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste F, no nível de 5% de probabilidade (dms= 4,69069)..... 70

Figura 4 - Efeito das concentrações de compostos de silício (silicato de sódio e dióxido de silício) sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim. As médias representam os valores obtidos para os dois compostos de silício, para cada concentração. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste F, no nível de 5% de probabilidade (dms= 4,69069)..... 70

Figura 5 - Efeitos de tratamentos com dióxido de silício (Si) e silicato de sódio (Na), em diferentes concentrações, sobre a redução de antracnose em frutos de melão Acclaim. H₂O + T: água mais Tween 80. Em todos os tratamentos, com exceção do Controle 2, foi adicionado Tween 80 a 0,01%. Os valores representam as médias dos tratamentos; as médias seguidas da mesma letra do Controle 1 (letra minúscula) ou Controle 2 (letra maiúscula) indicam não haver diferença significativa, conforme o Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (dms= 8,71805)..... 71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

- Tabela 1** - Experimento fatorial para análise dos efeitos de compostos de silício, em diferentes concentrações, sobre a inibição do crescimento micelial de *Coletotrichum brevisporum in vitro*..... 67
- Tabela 2** - Experimento fatorial para análise dos efeitos de compostos de silício, em diferentes concentrações, sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim..... 69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 O meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L.)	15
2.2 Doenças na pós-colheita.....	16
2.3 Gênero <i>Colletotrichum</i>	17
2.4 Taxonomia do gênero <i>Colletotrichum</i>	18
2.5 Defesas de plantas contra infecções	19
2.5.1 Cura de ferimentos	20
2.5.2 Defesas que atuam nos tecidos internos do fruto	21
2.5.2.1 Quitinases	21
2.5.2.2 Peroxidases	21
2.6 Controle de doenças	21
2.7 Indução de resistência a podridões em meloeiro	24
2.7.1 Elicitores	26
2.7.2 Resistência induzida quimicamente	26
2.7.2.1 Acibenzolar	26
2.7.2.2 Ácido oxálico	26
2.7.2.3 BABA	27
2.7.2.4 Quitosana	27
2.7.2.5 Silício	27
2.8. Genótipo da planta	29
2.9 Referências Bibliográficas.....	30
3. CAPÍTULO 2 - Análise de susceptibilidade de frutos de quatro cultivares de melão à podridões causadas por <i>Colletotrichum</i> sp.	43
3.1 Resumo	44
3.2 Abstract	45
3.3 Introdução	46
3.4 Material e Métodos	47
3.5 Resultados e Discussão	49
3.6 Conclusão	55
3.7 Referências bibliográficas	56
4. CAPÍTULO 3 – Uso de dióxido de silício e silicato de sódio no controle de antracnose na pós-colheita de melão	60
4.1 Resumo	61
4.2 Abstract	62
4.3 Introdução	63

4.4 Material e Métodos	64
4.5 Resultados e Discussão	66
4.6 Conclusão	72
4.7 Referências bibliográficas	72

1. INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) está entre as principais hortaliças produzidas no mundo, sendo sua produção mundial, no ano de 2013, de 27.656.511,87 toneladas. A China é o país que se destacou como maior produtor de melão no mundo com produção de 14.336.814 toneladas neste mesmo ano, enquanto o Brasil obteve produção de 565.900 toneladas sendo o Nordeste a Região que mais produziu a fruta (FAOSTAT, 2015).

Apesar do sucesso da cadeia produtiva do melão no Brasil, sobretudo na Região Nordeste, a produção do melão ainda está muito aquém da sua capacidade, visto que existe um grande potencial para expandir a produção desta hortaliça, se considerarmos a grande porção da Região Nordeste inserida no Semiárido e banhada pelo Rio São Francisco e demais bacias hidrográficas que são passíveis de irrigação (SALES JÚNIOR et al., 2006).

No entanto, um dos entraves que afetam a produção dessa cultura são os inúmeros patógenos pós-colheita atacam os frutos e causam perdas significativas, principalmente nos melões do grupo *cantalupensis*. Dentre os patógenos que atacam na pós-colheita estão *Colletotrichum* ssp., agente causal da antracnose (SANTOS; PINHEIRO-NETO, 2004).

A taxonomia do gênero *Colletotrichum* é bastante complexa devido ao grande número de espécies e ao fato dessas várias espécies poderem atacar um mesmo hospedeiro e, em algumas situações, uma única espécie causar lesões em hospedeiros diferentes (FREEMAN et al., 1998; CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009). Vários critérios já foram utilizados ao longo do tempo para a classificação das muitas espécies deste gênero, incluindo morfologia, temperatura de crescimento, compatibilidade vegetativa, sensibilidade ao fungicida benomyl e métodos moleculares (FREEMAN et al. 1998).

Características morfológicas não são suficientes para a classificação das espécies pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, uma vez que existe muita semelhança entre as espécies do gênero. Atualmente, a abordagem para classificação das espécies de *Colletotrichum*, necessariamente deve incluir a utilização de marcadores genéticos ao nível molecular para distinguir as diferentes espécies do gênero (CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012; O'CONNELL et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013; UDAYANGA et al., 2013). Neste contexto, os marcadores mais utilizados na taxonomia são: Espaçador Interno Transcrito (ITS); gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase (GAPDH); quitina sintetase 1 (CHS-1); histona 3 (HIS3), actina (ACT), β -tubulina (TUB2) e calmoduina (CAL) (DAMM; CANNON; LIU, 2013).

A correta identificação do patógeno está entre as estratégias requeridas para um bom manejo das doenças de plantas. Além disso, cada cultura e cada cultivar responde de uma maneira particular ao método de controle empregado.

Visando um manejo eficaz da antracnose no meloeiro, métodos alternativos têm sido testados, uma vez que os tratamentos convencionais estão, cada vez mais, na contramão do que é aceitável na atualidade devido aos efeitos danosos a saúde humana e ao ambiente (BI et al., 2010).

Diante disto, o emprego de compostos a base de silício (Si) vêm sendo testados no combate à doença em diversas culturas (QIN; TIAN, 2005; ANDERSON et al., 2005; LI et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010; LIU et al., 2010; MARODIN et al., 2011; BI et al., 2006; GUO et al., 2007; LI et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; CARRÉ-MISSIO et al., 2014). Este elemento químico representa 27,70% da litosfera e é o segundo mais abundante, depois do oxigênio (O). Trabalhos prévios demonstram que o uso do Si em frutos do melão reduz a severidade e incidência da podridão rosa, causada pelo fungo *Tricotecium roseum* (GUO et al., 2007, LI et al., 2012) e da podridão seca, causada por *Fusarium sulphureum*, em batata cv. Atlantic (LI et al., 2009).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar um isolado do gênero *Colletotrichum* ao nível de espécie; estabelecer entre este e frutos de melão uma relação patógeno hospedeiro; e propor um método alternativo de controle para antracnose.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

2.1 O meloeiro (*Cucumis melo* L.)

O meloeiro é uma planta que pertence à Divisão Magnoliophyta, à Classe Magnoliopsida, à Sub-classe Dilleniidae, à Superordem Violanae, à Ordem Cucurbitales, à Família Cucurbitaceae, à Tribo Melothrieae, à Subtribo Cucumerinae, ao gênero *Cucumis* e ao Subgênero Melo (JEFFREY, 1990).

As espécies da Família Cucurbitaceae, comumente conhecidas como cucurbitáceas, são, principalmente, plantas sensíveis ao frio e à geada, sendo encontradas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Contudo, algumas espécies são bem adaptadas às baixas temperaturas e condições xerófitas (WIEN, 1997).

As cucurbitáceas também podem ser classificadas, de acordo com a sua origem geográfica, em espécies do novo mundo ou do velho mundo. São subdivididas em duas subfamílias, oito tribos, cerca de 120 gêneros e mais de 800 espécies (JEFFREY, 1990). Os frutos são a parte da planta mais comumente consumida, mas outras partes também são utilizadas como alimentos, como sementes, folhas, brotos, raízes e flores (NUÑEZ-PALENIUS et al., 2008). Em adição, várias cucurbitáceas como *Cucurbita andreana* são exploradas como plantas medicinais por terem compostos químicos (cucurbitacinas) com atividades anticâncer e anti-inflamatória (JAYAPRAKASAM et al., 2003). Na China, frutos e raízes de *C. melo* são usados como emético, folhas e sementes para tratar hematomas e os caules para reduzir hipertensão (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997).

As principais cucurbitáceas cultivadas no mundo são, em ordem decrescente, melancia (*Citrullus lanatus* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e melão. Dentre elas, *C. melo* tem um dos mais altos polimorfismos de tipo de fruto e variedades botânicas. Isto é uma consequência da grande diversidade genética dentro da espécie. Comparado com outras espécies, vários frutos de melão têm excelente aroma, variedade de cores de polpa, sabores marcantes e mais suco (MLIKI et al., 2001). Os melões podem ser doces (para sobremesa) ou não-doces, estas últimas formas podem ser consumidas cruas, em conserva ou cozidas (STEPANSKY et al., 1999).

Para desvendar as relações filogenéticas desta planta com outras do gênero, Sebastian et al. (2010) determinaram o centro de origem e domesticação do meloeiro, utilizando análise de DNA dos cloroplastos e do ITS (Espaçador Interno Transcrito) de 113 acessos de *C. melo*, *C. sativus* (pepino) e algumas espécies silvestres de cucurbitáceas. Através da comparação das sequências analisadas, foi possível determinar que a origem do meloeiro é asiática e não

africana, como se pensava anteriormente; mais precisamente, o centro de origem do meloeiro está localizado próximo à Cordilheira do Himalaia, dos dois lados da fronteira, tanto do lado indiano, quanto do chinês. A suposição de que a origem do meloeiro era africana recaía nos dados de análise citogenética, uma vez que *C. melo* tem $2n = 24$ e algumas espécies silvestres africanas do gênero *Cucumis* também possuem o mesmo número. E assim, a China era considerada um centro secundário de diversidade, mesmo após as análises de DNA utilizando RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) terem sido realizadas (LUAN et al., 2008). Estas informações têm importância estratégica em programas de melhoramento genético do meloeiro, que visem incorporar genes de espécies silvestres proximamente relacionadas à espécie cultivada, particularmente no que diz respeito à resistência a doenças e pragas.

Devido à grande diversidade de formas, cores, tamanhos e sabores dos frutos de melão, Munger e Robinson (1991) propuseram uma classificação intraespecífica simplificada das variedades dessa planta. Eles dividiram *C. melo* em sete variedades botânicas. Uma única variedade chamada de *Agrestis* (tipos silvestres) e mais seis variedades comerciais, que são: *Cantalupensis*, *Inodorus*, *Conomon*, *Dudaim*, *Flexuosus* e *Momordica*, sendo *Inodorus*, *Cantalupensis* e os seus híbridos, compostos por melões doces e bastante produzidos e comercializados no Brasil. Já Robinson e Decker-Walters (1997) sugeriram uma classificação um pouco diferente para os melões comestíveis, com os seguintes grupos botânicos: *Conomon* (Ásia); *Flexuosus* (melão cobra, Oriente Médio); *Cantalupensis* (Oriente Médio); *Inodorus* (Oriente Médio, Sul da Europa); *Dudaim* (melão de bolso da Rainha, Ásia); *Chito* (melão manga, Ásia) e *Momordica* (melão estalo, Ásia).

2.2 Doenças na pós-colheita

Os principais agentes causadores de doenças na pós-colheita em frutas são os fungos. Isso se deve ao grande número de espécies patogênicas relacionadas com as diversas culturas vegetais e, também, à variedade de mecanismos de penetração, aliado à eficiência desses processos (TERAO et al., 2008). Além disso, *Chromistas* também causam prejuízos na pós-colheita (SANTOS; PINHEIRO NETO, 2004).

Alguns patógenos atacam uma ampla gama de espécies vegetais; outros, no entanto, são espécie-específicos. Os mecanismos de coevolução entre patógeno e hospedeiro trilham o caminho da crescente especialização (DOBZHANSKY, 1973). Patógenos que atuam como parasitas oportunistas penetram na planta através de ferimentos ou aberturas naturais porque

eles são desprovidos de enzimas que lhes permitam entrar diretamente, ou podem requerer plantas enfraquecidas para o seu desenvolvimento (MENGISTE et al., 2009). A primeira barreira de proteção das plantas contra o ataque de patógenos é provida pela cutícula e pela parede celular; essas estruturas podem barrar o desenvolvimento do patógeno, quando o mesmo não possui mecanismos (enzimas) capazes de romper essas estruturas (BI et al., 2010). Vários fungos secretam enzimas, tais como: cutinases; celulases; pectinases e proteases, essas atuam no sentido de facilitar ao fungo atravessar a cutícula e penetrar nas células da epiderme, atravessando a parede celular das mesmas (MENGISTE et al., 2009).

2.3 Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* inclui um grande número de patógenos de grande importância econômica, por causarem doenças em uma grande variedade de plantas lenhosas e herbáceas (YANG et al., 2009; CANNON et al., 2012; UDAYANGA et al., 2013). A sua distribuição geográfica primária é tropical e subtropical, mas algumas espécies se adaptaram para atacar culturas de clima temperado (CANNON et al., 2012).

Colletotrichum, pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Erysiphales e à Família Glomerellaceae, é um dos mais importantes dentre todos os fungos fitopatogênicos e foi posicionado no oitavo lugar de uma escala (*Top10*) dos principais fungos que atacam as culturas de maior importância, numa pesquisa em que votaram 495 dos mais conceituados pesquisadores mundiais ligados à área de Fitopatologia Molecular (DEAN et al., 2012). Sua importância se deve ao fato de as espécies do gênero atacarem praticamente todas as culturas, incluindo frutas, plantas ornamentais e legumes (SUSSEL, 2005; TANAKA et al., 2009; CANNON et al., 2012; DEAN et al., 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013). Estes fungos causam antracnose e podridões de pós-colheita. O termo antracnose foi formado a partir dos radicais gregos *Antrax* (carbúnculo) e *nosos* (doença) (HORST, 2013).

Devido à ampla gama de hospedeiros das espécies de *Colletotrichum*, o gênero tem grande importância econômica, porque, além das grandes culturas, ataca também plantas que produzem produtos alimentares de base, como mandioca, sorgo e banana, que servem de alimento para agricultores de subsistência, em países em desenvolvimento (DEAN et al., 2012). As perdas geradas pela ação do patógeno podem chegar a até 100% e a doença se desenvolve, principalmente, em pós-colheita, com o fungo permanecendo em estado quiescente entre pré e pós-colheita (PRUSKY, 1996).

Colletotrichum é uma forma assexuada, ou seja, um fungo imperfeito, que ataca dentre outras espécies as cucurbitáceas, como pepino, melão, melancia, jerimum (*Cucurbita pepo*; *Cucurbita maxima*) causando antracnose, principalmente na pós-colheita. A principal espécie do gênero *Colletotrichum* que causa antracnose em cucurbitáceas é *C. orbiculare* (sin. *Colletotrichum lagenarium*). As lesões produzidas por este patógeno incluem mudas, pecíolos, frutos e caules (DAMM; CANNO; LIU, 2013).

C. orbiculare já foi descrito em mais de 44 espécies de hospedeiros (FARR; ROSSMAN, 2015). O formato das lesões, produzidas pelo patógeno, nos frutos é circular, deprimido e apresentam umidade. Essas lesões expandem-se e tornam-se pretas, ocasionalmente assumindo coloração rosada, devido à massa de esporos que se forma (SUSSEL, 2005; DAMM; CANNON; LIU, 2013). Os esporos são caracterizados por serem retos e com o ápice obtuso, afinando-se para a base. A coloração varia de marrom escuro para preto ou é cinza escuro. Apresenta uma taxa de crescimento mais lenta do que a de *C. gloeosporioides*. As suas formas sexuais foram descritas como *Glomerella lagenaria* (DAMM; CANNON; LIU, 2013).

Outra espécie do gênero que começou a apresentar importância é *Colletotrichum brevisporum* originalmente descrita na Tailândia causando antracnose em *Neoregelia* sp. (Bromeliaceae) e em *Pandanus pygmaeus* (Pandanaeae), ambas, espécies ornamentais (NOIREUNG et al., 2012). Recentemente, foi descrita em mamão (*Carica papaya*) (VIEIRA et al., 2013) e em melão no presente trabalho.

2.4 Taxonomia do gênero *Colletotrichum*

Quando se iniciou a classificação do gênero *Colletotrichum*, as características morfológicas e os hospedeiros desses patógenos eram os principais critérios utilizados para a taxonomia, e com base nesses dados, percebeu-se que muitas das espécies que a princípio pareciam distintas, eram, na verdade, a mesma. Um dos motivos para essa confusão é que uma espécie de *Colletotrichum* pode atacar mais de um hospedeiro, outro motivo é que os caracteres morfológicos são plásticos, ou seja, podem variar de acordo com as condições experimentais. Isso gerou uma confusão que demandou análises mais refinadas. A partir daí, se iniciou uma nova fase na taxonomia do gênero, onde o uso de marcadores genéticos ao nível molecular passou a ser a tônica na classificação das espécies. A princípio, a análise da sequência do ITS foi amplamente utilizada na tentativa de separar as espécies entre si,

posteriormente, se lançou mão de novos marcadores como actina e β -tubulina, por exemplo (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009; YANG et al., 2011; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013; UDAYANGA et al., 2013).

No entanto, havia uma questão evolutiva importante e inerente a este tipo de análise que merecia uma atenção especial, quando se analisa filogenias baseadas em um único gene, corre-se o risco de estar acompanhando o processo evolutivo de um gene e não de uma espécie, uma vez que, no processo evolutivo de cada espécie, os organismos são selecionados no seu conjunto e não nos seus detalhes individuais. (GRIFFITHS et al., 2013). Seguindo este raciocínio lógico, a pesquisa da taxonomia do gênero *Colletotrichum* passou a empregar uma abordagem *multilocus*, ou seja, as árvores filogenéticas passaram a ser construídas a partir das análises combinadas de diversos marcadores genéticos, tentando, dessa forma, analisar a real posição taxonômica de cada espécie, em relação às demais do gênero, colocando cada uma em um clado específico. Isso aliando, também, caracteres morfológicos e da biologia do fungo, estabelecendo, dessa maneira, correlações entre genótipo e fenótipo (CAI et al., 2009; DAMM; CANNON; LIU, 2013).

Hyde et al. (2009) realizaram um levantamento detalhado de 66 espécies de *Colletotrichum* e mais 19 outros nomes de possíveis novas espécies do gênero que permaneciam em estado indefinido. Nesse trabalho, os autores compilaram dados de análises de DNA publicados ao longo de 17 anos, sendo uma importante referência para a taxonomia do gênero.

Assim, presentemente, o *Index fungorum* (www.indexfungorum.org/names/names.asp) registrou 800 epítetos para o gênero *Colletotrichum*, enquanto que o *Q-bank* (www.q-bank.eu/Fungi/), base de dados digital especializada em alguns fitopatógenos, descreve detalhadamente, incluindo dados de sequências moleculares, 118 espécies do gênero.

As espécies de *Colletotrichum* estão distribuídas em oito cladogramas diferentes, segundo trabalho realizado por Yang et al. (2011), em que os autores utilizaram seis marcadores genéticos (ACT, TUB 2, CHS I, CAL, GAPDH e ITS).

2.5 Defesas de plantas contra infecções

As respostas de defesa dos vegetais aos diferentes patógenos dependem do estilo de vida de cada patógeno (MENGISTE et al., 2009). Em geral, esses mecanismos de defesa ocorrem através de um conjunto de mecanismos ou barreiras pré ou pós-formados (SILVA et al., 2008).

As plantas desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos de defesa complexos para responder ao ataque de patógenos. Esses mecanismos, muitas vezes, são induzíveis e acionados a partir de um estímulo externo, que é chamado de elicitor. Essas respostas constituem a indução de resistência (HAMMERSCHMIDT, et al., 2001).

Existem três manifestações diferentes de resposta, que são: Resistência Local ou Reação Hipersensível (RH); Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI) (CONRATH et al., 2006). O primeiro tipo de manifestação se caracteriza por uma rápida morte celular no local da infecção por um patógeno é mediada por uma drástica mudança na atividade metabólica nas células próximas ao sítio de penetração do agente infeccioso (DURRANT; DONG, 2004). Na RSA, também ocorre necrose local, porém é produzido um sinal químico que se transloca para diversas partes da planta e induz reações de defesa que continuam atuando em infecções subsequentes. No terceiro tipo (RSI), o elicitor não provoca necrose, mas induz a planta a se proteger sistemicamente (SILVA et al., 2008). Sendo os mecanismos de ação da RSI bastante utilizados por pesquisadores para induzir resistência através de elicitores químicos.

2.5.1 Cura de ferimentos

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um produto compartilhado em todas as reações que envolvem as enzimas amino oxidases (AO) em plantas. Essas enzimas oxidam poliaminas e o H_2O_2 derivado dessas reações desempenha um importante papel na diferenciação da parede celular, atuando no direcionamento das ligações cruzadas dos componentes da parede celular ou comportando-se como um mensageiro secundário na sinalização da morte celular programada, como acontece, por exemplo, na diferenciação vascular em *Arabidopsis thaliana* (TISI et al., 2008). A presença de AOs ativas na parede celular de tabaco (*Nicotiana tabacum*) indicam a participação dessas enzimas no catabolismo de poliaminas dependentes da produção de H_2O_2 e, também, na lignificação dos tecidos vasculares. Quando a planta sofre dano mecânico ou quando está sob ataque de patógeno, ocorre uma alta produção dessas enzimas e também de H_2O_2 como parte das respostas de defesa do vegetal (TISI et al., 2008).

2.5.2 Defesas que atuam nos tecidos internos do fruto

2.5.2.1 Quitinases

O padrão de síntese proteica das plantas pode ser alterado devido a estresse abiótico, ao contato com um patógeno ou em resposta a um ferimento. Dentre as proteínas relacionadas à patogênese (PRs), incluem-se as quitinases, que possuem a capacidade de degradar paredes celulares de fungos (DALLA COSTA et al., 2010).

2.5.2.2.Peroxidases

As peroxidases são enzimas que apresentam um elevado número de isoformas, compõem uma grande família multigênica e estão presentes em todas as plantas terrestres. Estão envolvidas em processos distintos como, por exemplo: gerar espécies reativas de oxigênio; compostos da parede celular e regular os níveis de H₂O₂ (PASSARDI et al., 2005).

Em condições de estresse salino, plantas de uma cultivar de algodão (*Gossypium* spp.) tolerante a altos níveis de salinidade (Pora) tiveram seus níveis de atividade de peroxidase aumentados, ao passo que em outra cultivar (Guazuncho) não resistente à salinidade elevada, não houve aumento da atividade dessa enzima, levantando a questão de que a enzima, que é antioxidante, atua protegendo a planta de espécies reativas de oxigênio (MELONI et al., 2003).

Além disso, quando a planta encontra-se em condições de estresse, a enzima pode induzir a construção de uma parede rígida, protegendo, assim, o vegetal de determinados patógenos, ou ainda, produzir espécies reativas de oxigênio para tornar a parede mais flexível, dependendo do caso (PASSARDI et al., 2005).

2.6 Controle de doenças

A conservação dos frutos de melão no pós-colheita é uma preocupação dos produtores, devido, principalmente, às perdas decorrentes das injúrias mecânicas produzidas, na colheita, no transporte e no armazenamento (BATISTA; BORGES, 2013).

Além disso, outras alterações podem comprometer a qualidade dos frutos, como crescimento de microrganismos, perda de água, produção de etileno, que acelera o metabolismo, perda da firmeza da polpa e perda da coloração (SILVEIRA et al., 2011). No caso dos melões do Grupo Cantaloupe, a susceptibilidade é maior que as das outras cultivares

devido às características desses frutos, ou seja, casca mais fina e à presença da rede de cortiça que reveste os frutos e cria microambientes favoráveis para o desenvolvimento de patógenos (FAN et al., 2008).

Nesse sentido, têm-se usado diversos tipos de tratamentos para conservar os frutos, como por exemplo, água quente, peróxido de hidrogênio e baixas doses de radiação gama, para a desinfecção de frutos de Cantaloupe, com o objetivo, inclusive, de reduzir patógenos de seres humanos, como bactérias do gênero *Salmonella* (FAN et al., 2008).

Para evitar microrganismos, tanto causadores de doenças de plantas, como de humanos, diversos métodos de conservação e desinfecção dos frutos, em pós-colheita, têm sido testados. No entanto, é preciso observar o custo benefício desses métodos, aliando a isso, a avaliação dos possíveis riscos gerados pelo tratamento, tanto para o ambiente, quanto para a saúde humana.

O principal método utilizado na conservação de frutos de melão na pós-colheita é a refrigeração (MENDONÇA et al., 2005), mas diversos outros métodos são utilizados, muitos em combinação com este, como por exemplo: revestimentos comestíveis (OMS-OLIU et al., 2008); tratamento térmico (FAN et al., 2008; SILVEIRA et al., 2011); atmosfera modificada (PORTELA e CANTWELL, 1998; PRADO et al., 2005); irradiação (CIA et al., 2007); antimicrobianos naturais (BOSQUEZ-MOLINA et al., 2010; YU et al., 2010); agentes de firmeza (FALLIK et al., 2000); alta pressão (SMILANICK et al., 1999) e antioxidantes (YAO; TIAN, 2005).

Revestimentos comestíveis foram testados num experimento conduzido por Oms-Oliu et al. em 2008. No ensaio, foram analisados alginato, pectina e *gellan*, cada um juntamente com cloreto de cálcio, no envolvimento da superfície de melões Pele de Sapo, em um experimento em que foi testada a manutenção de características importantes dos frutos, como consistência, cor, qualidade sensorial, propriedades antioxidantes, trocas gasosas e crescimento microbiano, após 15 dias a 4° C. Esses revestimentos fizeram diminuir a desidratação dos frutos e inibiram a produção de etileno. O cloreto de cálcio ajudou a manter a firmeza dos frutos, por formar ligações cruzadas. A pectina se mostrou melhor na manutenção dos atributos sensoriais do que os outros agentes testados. Porém, estes revestimentos comestíveis não são capazes de impedir infecções por agentes microbianos (OMS-OLIU et al., 2008).

Fan et al. (2008) imergiram melões Cantaloupe inteiros em água quente (76 °C) por três minutos, para desinfetar as cascas, e confrontaram esses resultados com os de um controle

tratado com água a 10 °C, por 20 minutos, e com os de outro tratamento, que empregava cloro a 20 partes por milhão, a 10 °C, por 20 minutos. Constataram que a água aquecida era capaz de reduzir bastante a microflora das superfícies das cascas dos melões, principalmente em relação às bactérias, porém, o tratamento a 76 °C era incapaz de reduzir a população de leveduras e fungos de uma maneira geral.

Silveira et al. (2011) analisaram o efeito, sobre melões Galia, da imersão em água quente e do uso de outros tratamentos para substituir o uso de cloro na desinfecção dos frutos. Além da água quente (60 °C), os autores testaram ácido peracético (80 mg/L), a 5 °C, e água (5 °C), contida em embalagens de polipropileno e com ar de atmosfera modificada passiva (7.4 kPa O₂ e 7.4 kPa CO₂). Nesse trabalho, foram analisados os seguintes parâmetros: carga microbiana; retenção da qualidade do fruto fresco; emissão de etileno; taxa de respiração; firmeza da polpa e quantidade de poliaminas livres. Como resultado, foi verificado que o tratamento com água aquecida e, também, o tratamento com água mais ácido peracético são capazes de substituir o uso de cloro na sanitização de melões.

O controle da atmosfera de estocagem é utilizado para manter a qualidade de melões. Portela e Cantwell (1998) compararam atributos sensoriais de fragmentos de frutos de melão tipo Honeydew, estocados em ar atmosférico e em atmosfera modificada (ar + 15% de CO₂), e verificaram que a concentração de sólidos solúveis, a cor e a firmeza decaíram bem menos, ao longo de 12 dias, em frutos mantidos sob atmosfera controlada do que em frutos mantidos apenas no ar.

Prado et al. (2005) também testaram atmosferas modificadas (passiva- controle, ativa com 5% de CO₂ e 5% de O₂ e ativa com 10% de CO₂ e 2% de O₂) na conservação de frutos de melões tipo Orange Flesh. Os autores analisaram, durante oito dias, as variações na firmeza dos frutos, no pH, nos sólidos solúveis totais, na pectina total, na acidez total titulável, nos açúcares solúveis totais, na pectina solúvel, e as atividades das enzimas pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG). Os autores encontraram uma menor solubilização de pectinas nas amostras armazenadas sob atmosfera com 10% de CO₂ e 2% de O₂. Não foram detectadas atividades das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase nos tratamentos analisados. Nos outros parâmetros analisados, não houve variação significativa entre as atmosferas passiva e ativas.

2.7 Indução de resistência a podridões em meloeiro

Com a pressão da sociedade aumentando sobre o uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura (EL-GHAOUTH et al., 1998; TIAN; CHAN, 2004), a pesquisa agrícola tem sido direcionada cada vez mais para obter resistência das culturas às doenças e às pragas, tanto no campo quanto na pós-colheita, evitando ou diminuindo, assim, o uso dos pesticidas. Os custos do desenvolvimento de novos agrotóxicos são elevados, o que torna esse cenário ainda mais complexo (HUANG et al., 2000; LI et al., 2012). Nesse sentido, as estratégias estabelecidas pelos pesquisadores para controlar as doenças que atacam o meloeiro, envolvem: seleção genética de variedades resistentes através de programas de melhoramento genético e indução de resistência adquirida em plantas. Dentre essas estratégias, a primeira é interessante, uma vez que dispensa o uso de produtos químicos de qualquer natureza. No entanto, nem sempre existe uma variabilidade natural disponível (ou descoberta) para cada um dos patógenos ou pragas existentes, capaz de prover genes de resistência. Além disso, os programas de melhoramento demandam um longo tempo.

Nesse contexto, a indução de resistência, surge como uma alternativa muito importante, particularmente, para o controle de doenças, uma vez que os elicitores (moléculas capazes de desencadear uma resposta de defesa) (ZHANG et al., 2009) usados são absorvidos pelo vegetal ou parte dele (frutos, por exemplo) e, geralmente, não têm efeitos deletérios sobre o ambiente nem sobre a saúde humana. O que se caracteriza como uma vantagem, uma vez que se pode utilizar um mesmo elicitor para prevenir o ataque de diversos patógenos, maximizando, nesse aspecto, a eficácia do controle. A percentagem de redução das doenças em plantas por esses métodos varia entre 20 e 85% (WALTERS; RATSET; HAVIS., 2013), o que a princípio pode parecer pouco, mas quando se consideram os ganhos em termos de saúde humana e de segurança ambiental, esses percentuais não parecem tão pequenos, principalmente quando levamos em conta o desenvolvimento de resistência a agrotóxicos por parte dos patógenos. Esse tipo de abordagem se inclui no manejo integrado de pragas (MIP) (TERRY; JOYCE, 2004), que representa, indubitavelmente, uma forte tendência na agricultura moderna (BI et al., 2010; QUAGLIA et al., 2011; WALTERS; RATSET; HAVIS., 2013).

Segundo Lucas (1999) e Kué (2000), o aumento dos mecanismos de defesa dos tecidos da planta hospedeira durante os períodos de suscetibilidade, através da indução de resistência adquirida, é considerada a estratégia preferencial para alcançar o manejo integrado de pragas (MIP).

Os frutos das diversas plantas obedecem a um ciclo natural de desenvolvimento que vai desde a fecundação do óvulo pelo grão de pólen, passando pela maturação e culminando no apodrecimento. Neste processo, os diversos mecanismos de defesa contra patógenos e insetos praga que a planta possui, especificamente nestas estruturas, vão se alterando e os que não estão presentes inicialmente podem ser estimulados a desenvolver-se por ação de um elicitor. As defesas previamente presentes e as que surgem após a elicitação, constituem, no conjunto, a resistência natural às doenças (RND) (TERRY; JOYCE, 2004). Estas tendem a declinar, levando concomitantemente, à infecção e, conseqüentemente, à morte do fruto.

Nas plantas que constituem as culturas de importância econômica, as doenças que atacam os frutos são usualmente fungos e estes, em grande número de casos, atacam após a colheita, haja vista as diversas podridões. Estes agentes infecciosos geralmente estão presentes em uma forma latente ou quiescente (PRUSKY; KEEN, 1993). Infecções quiescentes são infecções que se instalam nos frutos, bem antes do amadurecimento dos mesmos, sem serem percebidas e, com o avanço do processo de amadurecimento, os sintomas aparecem (AMORIM; PASCHOLATI, 2011). O declínio das RNDs ocorre paralelamente à ativação dos mecanismos de infecção que permaneciam em estado quiescente (TERRY; JOYCE, 2004).

A possibilidade de utilizar compostos que possam induzir resistência em plantas, sem causar danos ambientais e nem a saúde humana, justifica plenamente o desenvolvimento de pesquisas nesta área. Além disso, as descobertas de diferentes moléculas antifúngicas de ocorrência natural podem ser utilizadas na seleção de cultivares que apresentem resistência genética a determinado patógeno pelo seu padrão de expressão gênica, reduzindo assim, o tempo de seleção de campo. Quando se aplica um determinado composto de origem vegetal para induzir resistência, a ideia que está associada a isto é que este composto é seguro, uma vez que o mesmo é produzido pela própria planta e evoluiu na natureza para atuar especificamente nesta função. Adicionalmente, substâncias simples como silicato de sódio (Na_2SiO_3) abundantes na natureza podem também induzir resistência em plantas sem que o seu uso provoque efeitos indesejáveis à saúde humana ou ao ambiente (GUO et al., 2007; LI et al., 2009; LI et al., 2012). Contudo, determinados extratos vegetais causam danos à saúde animal. Algumas dessas substância atuam como venenos naturais e tem a função de proteger o vegetal contra a herbivoria, por exemplo.

2.7.1 Elicitores

Os elicitores de resistência natural a doenças (RND) podem ser agentes biológicos, químicos ou físicos e podem induzir resistência local adquirida (RLA), resistência sistêmica adquirida (RSA) ou resistência sistêmica induzida (RSI) (TERRY; JOYCE, 2004). Esse conceito refere-se a uma resposta benéfica por parte da planta a doses baixas ou subletais de um agente/elicitador, semelhante a um indutor químico ou a um estresse físico. Nos últimos anos, a importância da compreensão dos mecanismos de indução de resistência na proteção de plantas tem sido amplamente reconhecida (MENGISTE et al., 2009; BI et al., 2010).

2.7.2 Resistência induzida quimicamente

Pepino e melão, especialmente, e as cucurbitáceas de uma maneira geral, têm sido bastante utilizados em estudos de resistência sistêmica adquirida (RSA) e de resistência induzida (RI) (HUANG et al., 2000; GUO et al., 2007; LIU et al., 2007; ZHANG et al., 2009; WALTERS; RATSET; HAVIS., 2013). A seguir, destacam-se algumas substâncias empregadas com a finalidade de induzir resistência em plantas.

2.7.2.1 Acibenzolar

O acibenzolar (benzo-(1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbo-thioic acid S-methylester; ASM; BTH; BionTM; ActigardTM) é provavelmente, o mais potente RSA descoberto até o momento (BI et al., 2010). Esse indutor de resistência, é o análogo sintético do ácido salicílico desenvolvido especificamente para atuar na RSA. O acibenzolar em concentrações de 50 e 100 µg/ml protege completamente melões Cantaloupe contra *C. orbiculare*, induzindo a acumulação sistêmica de quitinase e impedindo, assim a instalação da antracnose (SMITH-BECKER et al., 2003).

2.7.2.2 Ácido oxálico

Zheng et al. (2007a) testaram o composto em manga (*Mangifera indica*), com bons resultados. Zheng et al (2007b) testaram as respostas fisiológicas de frutos de pêssigo (*Prunus persica*) cv. “Bayuecui” a duas concentrações (1 e 5 mM) de ácido oxálico; os frutos foram armazenados à temperatura de 25 °C. Os autores constataram que havia aumento nas atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD); peroxidase (POX);

catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX) e oxidase de polifenol (PPO), quando comparado com o grupo controle. O aumento das atividades das enzimas POX, SOD e PPO pode representar um aumento da resistência dos frutos à ação de fitopatógenos.

2.7.2.3 BABA

BABA (ácido β -aminobutírico) atua como um potente indutor de RA e tem um amplo espectro de atuação contra agentes patogênicos (COHEN, 2002). Essa substância induz um aumento da atividade de enzima POX e reduz as podridões provocadas por *Alternaria* e *Fusarium* em frutos de melão, quando aplicado a uma concentração de 2000 mg/L (BOKSHI et al., 2006).

2.7.2.4 Quitosana

A quitosana, quando aplicada a bagas de uva “*Italia*”, é capaz de reduzir os efeitos do mofo cinzento causado por *Botrytis cinera* nos frutos, nas concentrações de 1,5 e 2,0%, e inibir o crescimento do fungo *in vitro* nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, durante um período de incubação de cinco dias, a cerca de 22 °C (CAMILI et al., 2007).

Esse composto tem apresentado resultados promissores quando utilizado em algumas outras culturas, como, por exemplo, em maçã (BAUTISTA-BAÑOS et al, 2004), uva (MENG et al., 2008), tomate (LIU et al., 2007) e framboesa (*Rubus idaeus*) (TEZOTTO-ULIANA et al., 2014).

Tezotto-Uliana et al. (2014) mostraram que a aplicação de quitosana a 1 ou 2% em pós-colheita, e 2% em pré-colheita foi capaz de conservar os atributos de qualidade importantes dos frutos de framboesa por 15 e 12 dias, respectivamente. Como são frutos muito perecíveis, a manutenção da hidratação e do teor de ácido ascórbico dos frutos por um período maior é importante e a aplicação de quitosana atua diminuindo a taxa de respiração e a produção de etileno.

2.7.2.5 Silício

Dentre os elementos traços encontrados na litosfera, o silício (Si) é o mais abundante, com um percentual de 27,70% (PAIS; JONES, 1997). Nessa situação, este elemento químico preenche um importante requisito no uso de substâncias que desempenham um papel na

indução de RSA, ou seja, a abundância. Outro requisito muito importante que o Si preenche é o fato de ser GRAS, acrônimo da expressão em Inglês: *Generally Recognized as Safe*, com números de registro no FDA (*Food and Drug Administration*) de 21CFR 182.90 e 21CFR 182.1711, sendo, inclusive, utilizado na indústria alimentícia. Além disso, o Si é considerado biologicamente ativo e desencadeia uma rápida e mais extensa resposta das defesas naturais da planta (FAUTEAUX et al., 2005). Por exemplo, Dann e Muir (2002) verificaram que o crescimento de plântulas de ervilha (*Pisum sativum*), em meio de cultura contendo elevados níveis de silício, faz aumentar os níveis das proteínas de resistência quitinase e β -1,3-glucanase.

Existem relatos na literatura da ação do silício na prevenção de doenças em diversas culturas, como por exemplo, em cereja (*Prunus avium*) (QIN ; TIAN, 2005), em abacate (*Persea americana*) (ANDERSON et al., 2005), em batata (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) (LI et al., 2009), em morango (*Fragaria vesca*) (FIGUEIREDO et al., 2010), em *Citrus* (LIU et al., 2010), em tomate (*Solanum lycopersicum*) (MARODIN et al., 2011), em melão (BI et al., 2006; GUO et al., 2007; LI et al., 2012), em orquídea (*Dendrobium nobile*) (CARVALHO et al., 2013) e em café (*Coffea arabica*), (CARRÉ-MISSIO et al., 2014).

Quando aplicado em pré-colheita em árvores de abacateiro, o silício solúvel foi capaz de reduzir, tanto a severidade, quanto a incidência da antracnose nos frutos (ANDERSON et al., 2005). Aplicação de Si em pós-colheita suprimiu doenças em diversos casos, como em melão com relação a podridão rosa, causada por *Tricotecium roseum* (BI et al., 2006; GUO et al., 2007; LI et al., 2012) e podridão seca em túberas de batata, causada por *Fusarium sulphureum* em batata cv. Atlantic (LI et al., 2009).

A ação do silicato de sódio na prevenção de doenças de plantas se dá, também, diretamente sobre o patógeno. Li et al. (2009) relataram que o composto químico inibe a germinação dos esporos e o crescimento micelial de *Fusarium sulphureum*. Carré-Missio et al. (2014) descreveram a ação de silicato de potássio no controle da ferrugem da folha do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix*. Os autores mostraram que o composto químico tem efeito positivo no controle da doença e demonstraram, também, através de microscopia eletrônica de varredura, que se formam cristais do sal silicato de potássio, que se depositam sobre a face adaxial das folhas do vegetal, quando o mesmo é aspergido sobre a parte aérea da planta. Esses cristais impedem a germinação dos esporos, o crescimento micelial e, ainda, impedem fisicamente a penetração dos fungos e fazem com que as células do patógeno sequem.

2.8. Genótipo da planta influenciando na resistência a doenças

Diferentes espécies vegetais respondem de maneira distinta à indução de resistência. Além disso, diferentes variedades de uma mesma espécie de planta podem apresentar marcantes diferenças na expressão da resistência induzida (WALTERS; RATSET; HAVIS., 2013). Ou seja, o genótipo do hospedeiro afeta diretamente a indução de resistência, uma vez que as proteínas expressas durante o processo de indução são um reflexo dos *alelos* presentes naquele indivíduo (TUCCI et al., 2011). Trabalhando com cevada (*Hordeum vulgari* L.), Walters et al. (2011), analisaram a influência do genótipo do hospedeiro sobre a expressão da resistência induzida a patógenos foliares, como por exemplo, o fungo *Rhynchosporium commune* que causa escaldadura das folhas. Os autores utilizaram uma combinação de elicitores de resistência (BABA, ASM e *cis-jasmone*) e descobriram que a expressão da resistência variava muito entre as variedades testadas. Houve variedades que expressaram indução de resistência e outras que não. Interessantemente, não houve uma correlação positiva entre a classificação de resistência da variedade a *R. commune* e a sua capacidade de expressar resistência induzida (WALTERS et al., 2011).

Córdova-Campos et al. (2012) mostraram que a resistência basal induzida à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* foi diminuída em *Phaseolus vulgaris* ao longo do processo de domesticação, uma vez que foi significativamente maior em acessos silvestres de feijão do que em cultivares modernas. O tratamento com ASM elevou a resistência ao patógeno nos acessos silvestres e nas variedades crioulas, mas não nas cultivares modernas. Aparentemente, no processo de domesticação de *P. vulgaris*, a seleção para o aumento da produtividade, levou à perda de uma parte considerável dos genes de resistência basal e dos de resistência induzida de amplo espectro (CÓRDOVA-CAMPOS et al., 2012).

Referências Bibliográficas

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Editora Ceres, 2011. v. I, p. 59-100.

ANDERSON, J. M.; PEGG, K. G.; DANN, E. K.; COOKE, A.W.; SMITH, L.A.; WILINGHAM, S. L.; GIBLIN, F. R.; DEAN, J. R.; COATES, L.M. New strategies for the integrated control of avocado fruit diseases. In: NEW ZEALAND AND AUSTRALIA AVOCADO GROWER'S CONFERENCE'05, Session 3, Pest disease control strategies, integrated production systems and the impact on market access, 2005, Tauranga. 6 pages.

BATISTA, A. P.; BORGES, C. D. Métodos de conservação aplicados a melão minimamente processado. **Ciência Rural**, v. 43, n.5, p. 915-923, 2013.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; DeLUCCA A. J.; WILSON, C.L. Evaluation of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest blue mould of apples during storage. **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 22, n. 3, p. 362-369, 2004.

BI, Y.; TIAN, S. P.; GUO, Y. R., GE, Y. H.; QIN, G. Z. Sodium Silicate Reduces Postharvest Decay on Hami Melons: Induced Resistance and Fungistatic Effects. **Plant Disease**, v. 90, p. 279-283, 2006.

BI, Y.; LI, Y.; GE, Y.; WANG, Y. Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases. In: PRUSKY, D.; M. L. GULLINO (Eds.). Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, 2010. v. 2, p. 31-41.

BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; McCONCHIE, R. M.; DEVERALL, B. J. Pre-harvest application of 2,6-dichloroisonicotinic acid, β -aminobutyric acid or benzothiadiazole to control post-harvest storage diseases of melons by inducing systemic acquired resistance (SAR). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 700-706, 2006.

BOSQUEZ-MOLINA, E.; RONQUILLO-DE JESÚS, E.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VERDE-CALVO, J.R.; MORALES-LÓPEZ, J. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, v. 57, p. 132–137, 2010.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.M.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva ‘Itália’ contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, 215-221, 2007.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181–213, 2012.

CARVALHO, P. R.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; ANDRADE JÚNIOR, O. Efeito do silício na qualidade de flores de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 4, 1615-1622, 2013.

CARRÉ-MISSIO, V.; RODRIGUES, F. A.; SCHURT, D. A.; RESENDE, R. S.; SOUZA, N. F. A.; REZENDE, D. C.; MOREIRA, W. R.; ZAMBOLIM, L. Effect of foliar-applied potassium silicate on coffee leaf infection by *Hemileia vastatrix*. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p. 396-403, 2014.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A.; CAMILI, E. C.; SANTOS, C. A. Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 3, p. 366-377, 2007.

COHEN, Y. R. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. **Plant Disease**, v. 86, p. 448-457, 2002.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J.M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; PRIME-A-PLANT GROUP et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 1062-1071, 2006.

CÓRDOVA-CAMPOS, O.; ADAME-ÁLVAREZ, R. M.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; HEIL, M. Domestication affected the basal and induced disease resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 367–379, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y.; SHIVAS, P. R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1–36, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, 2013.

DANN, E. K.; MUIR, S. Peas grown in media with elevated plant-available silicon levels have higher activities of chitinase and β -1,3-glucanase, are less susceptible to a fungal leaf spot pathogen and accumulate more foliar silicon. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 9-13, 2002.

DALLA COSTA, M.; LOVATO, P. E.; SETE, P. B. Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 376-383, 2010.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; PIETRO, AD; SPANU,P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DOBZHANSKY, T. **Genética do processo evolutivo**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1973.

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

EL-GHAOUTH, A.; WILSON C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. ***Journal of Phytopathology***, v. 88, p. 282-291, 1998.

FALLIK, E.; AHARONI, Y.; COPEL, A.; RODOV, V.; TUVIA-ALKALAI, S.; HOREV, B.; YEKUTIELI, O.; WISEBLUM, A.; REGEV, R. Reduction of postharvest losses of Galia melon by a short hot-water rinse. ***Plant Pathology***, v. 49, p. 333-338, 2000.

FAN, X.; ANNOUS, B.A.; BEAULIEU, J.C.; SITES, J.E. Effect of Hot Water Surface Pasteurization of Whole Fruit on Shelf Life and Quality of Fresh-Cut Cantaloupe. ***Journal of Food Science***, v. 73, n. 3, p. M91-98, 2008.

FAOSTAT. Disponível em

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em 20 de janeiro de 2015.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. (2015) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>> Acesso em 27 de janeiro de 2015.

FAUTEAUX, F.; REMUS-BOREL, W.; MENZIES, J. G.; BELANGER, R. R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. ***Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters***, v. 249, p. 1-6, 2005.

FIGUEIREDO, F. C.; BOTREL, P. P.; TEIXEIRA, C. P.; PETRAZZINI, L. L.; LOCARNO, M.; CARVALHO, J. G. Pulverização foliar e fertirrigação com silício nos atributos físico-químicos de qualidade e índices de coloração do morango. ***Ciência e Agrotecnologia***, v. 34, n. 5, 1306-1311, 2010.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J. **Introdução à genética**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.

GUO, Y.; LIU, L.; ZHAO, J.; BI, Y. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichotecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). **International Journal of Food and Technology**, v. 42, p. 1012-1018, 2007.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 1 – 6, 2001.

HORST, R. K. Anthracnose. In: HORST, R. K. **Westcott's Plant Disease Handbook**. Dordrecht: Science + Business Media, 2013. p. 59-67.

HUANG, Y., DEVARALL, B. J., TANG, W. H., WANG, W.; WU, F. W. Foliar application of acibenzolar-S-methyl and protection of postharvest rock melons and Hami melons from disease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 651-656, 2000.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-182, 2009.

Index Fungorum. Disponível em <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>> Acesso em 20 de janeiro de 2015.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer Letters**, v. 189, p. 11-16, 2003.

JEFFREY, C. Systematics of the Cucurbitaceae: An overview; and Appendix: An outline classification of the Cucurbitaceae. In: BATES, D. M.; ROBINSON, R. W.; JEFFREY, C. (Eds.). **Biology and utilization of the Cucurbitaceae**. Ithaca: Cornell Univ. Press, 1990. p. 3-9; 449-463.

KUÉ, J. Development and future direction of induced systemic acquired resistance in plants. **Crop Protection**, v. 19, p. 859-861, 2000.

LI, Y. C.; BI, Y.; GE, Y. H.; SUN, X. J. WANG, Y. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot of potato tubers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 213 – 218, 2009.

LI, W.; BI, Y.; GE, Y.; LI, Y.; WANG, J.; WANG, Y. Effects of postharvest sodium silicate treatment on pink rot disease and oxidative stress-antioxidative system in muskmelon fruit. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 137-145, 2012.

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

LIU, J.; ZONG, Y.; QIN, G.; LI, B.; TIAN, S. Plasma membrane damage contributes to activity of silicon against *Penicillium digitatum*. **Current Microbiology**, v. 61, p. 274-279, 2010.

LUAN, F.; DELANNAY, I.; STAUB, J. E. Chinese melon (*Cucumis melo* L.) diversity analyses provide strategies for germplasm curation, genetic improvement, and evidentiary support of domestication patterns. **Euphytica**, v. 164, p. 445-461, 2008.

LUCAS, J.A. Plant immunization: from myth to SAR Journal. *Pest. Sci.*, v. 55, p. 193-196, 1999.

MARODIN, J. C.; RESENDE, J. T. V.; SCHWARZ, K.; GALVÃO, A. G.; MORALES, R. G. F.; DIAS, D. M.; ZANIN, D. S. Qualidade pós-colheita de frutos de tomateiro em função de fontes e doses de silício. *Horticultura Brasileira*, v. 29, n. 2, 2011.

MELONI, D.A.; OLIVA, M.A.; MARTINEZ, C.A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, v. 49, p. 69-76, 2003.

MENG, X. H.; LI, B. Q. LIU, J.; TIAN S. P. Physiologic responses and quality attributes of table grape to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, v. 106, p. 501-508, 2008.

MENDONÇA, F.V.S.; MENEZES, J.B.; GOIS, V.A.; NUNES, G.H.S.; SOUZA, P.A.S.; MENDONÇA JÚNIOR, C.F. Armazenamento refrigerado de melão Orange Flesh. *Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 1, p. 15-18, 2005.

MENGISTE, T; LALUK, K.; ABUQAMAR, S. Mechanisms of induced resistance against *B. cinerea*. In: PRUSKY, D.; M. L. GULLINO (Eds.). *Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, 2010. v. 2, p.13-30.

MLIKI, A.; STAUB, J. E.; SUN, Z. Y.; GHORBEL, A. Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): An evaluation of African germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 48, p. 587–597, 2001.

MUNGER, H. M.; ROBINSON, R. W. Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, 14, p. 43-44 (article 14), 1991.

NOIREUNG, P.; PHOULIVONG, S.; LIU, F; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; JONES, E.B.G.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K.D. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, n. 3, Numero special Coelomycetes, p. 347-362, 2012.

NUÑEZ-PALENIUS, H. G., GOMEZ-LIM, M.; OCHOA-ALEJO, N.; GRUMET, R., LESTER, G; CANTLIFFE, D.J. Melon Fruits: Genetic Diversity, Physiology, and Biotechnology Features. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 13–55, 2008.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMULLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, J. A.; DUVIC, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, D.; HENRISSAT, B.; HOWARD, R. J.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y., LAW, A. D.; LEBRUN, M. H.; LEE., Y. H.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTROM, K.; PANACCIONE, D. G.; PANSTRUGA, R.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J.A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STUBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; van der DOES, H. C.; VOLL, L. M.; WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; van THEMAAT, E. V. L.; MA, L. J.; VAILLANCOURT, L. J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-1067, 2012.

OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTI N-BELLOSO, O. Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1862-1870, 2008.

PAIS, I.; JONES-JR, J. B. **The Handbook of Trace Elements**. Boca Raton: CRC Press LLCC, 1997.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 255–265, 2005.

PORTELA, S. I.; CANTWELL, M. I. Quality changes of minimally processed honeydew melons stored in air or controlled atmosphere. **Postharvest Biology and Technology**, v. 14, p. 351–357, 1998.

- PRADO, M. E. T.; CHITARRA, A. B.; RESENDE, J.V. Armazenamento de melão 'orange flesh' minimamente processado sob atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 2, p. 346-352, 2005.
- PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest disease. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 413-434, 1996.
- PRUSKY, D.; KEEN, N. T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Disease*, v. 77, p. 114-119, 1993.
- PRUSKY, D., WATTAD, C.; KOBILER, I. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 9, p. 864-868, 1996.
- Q-Bank. Disponível em <<http://www.q-bank.eu/Fungi/Biolomics.aspx?Table=All%20species%20ONLINE&genlist=t&T1474=Colletotrichum&fields=name&fields=E1501&fields=E1502>> Acesso em 20 de janeiro de 2015.
- QIN, G. Z.; TIAN S. P. Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved. **Phytopathology**, v. 95, p. 69–75, 2005.
- QUAGLIA, M.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S; ZAZZERINI, A. Biological control agents and chemical inducers of resistance for postharvest control of *Penicillium expansum* Link. on apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, p. 307-315, 2011.
- ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTERS, D. S. **Cucurbits**. Wallingford: CAB (Commonwealth Agricultural Bureaux) International, 1997.
- SALES JÚNIOR, R.; DANTAS, F. F.; SALVIANO, A. M.; NUNES, G. H. S. Qualidade do melão exportado pelo porto de Natal-RN. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 286-289, 2006.

SANTOS, A. A.; PINHEIRO NETO, L. G. Podridão-de-Esclerócio do Melão no Estado do Ceará. **Comunicado Técnico** 96, Embrapa, 2004.

SEBASTIAN, P.; SCHAEFER, H.; TELFORD, I. R. H.; RENNER, S. S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melon*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 14269-14273, 2010.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Documentos Embrapa**, 250, 2008.

SILVEIRA, A. C.; AGUAYO, E.; ESCALONA, V. H.; ARTÉS, F. Hot water treatment and peracetic acid to maintain fresh-cut Galia melon quality. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 569–576, 2011.

SMILANICK, J. L.; MARGOSAN, D. A.; MLIKOTA, F.; USALL, J.; MICHAEL, I. F. Control of Citrus Green Mold by Carbonate and Bicarbonate Salts and the Influence of Commercial Postharvest Practices on Their Efficacy. **Plant Disease**, v. 83, p. 139-145, 1999.

SMITH-BECKER, J.; KEEN, N. T.; BECKER, J.O. Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. **Crop Protection**, v. 22, p. 769–774, 2003.

STEPANSKY, A.; KOVALSKI, I.; PEARL-TREVES, R. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, p. 313-332, 1999.

SUSSEL, A. A. B. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas**. 2005. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ USP, Piracicaba, janeiro de 2005.

TANAKA, S.; ISHIHAMA, N.; YOSHIOKA, H.; HUSER, A.; O'CONNELL, R.; TSUJI, G.; TSUGE, S.; KUBO, Y. The *Colletotricum orbiculare* ssd1 mutant enhances *Nicotiana benthamiana* basal resistance by activating a mitogen-activated protein kinase pathway. **The Plant Cell**, v. 21, 2517-2526, 2009.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; VIANA, F. M. P.; SARAIVA, A. C. M. Estratégias de Controle de Podridões em Pós-Colheita de Melão: uma Revisão. **Documentos** 112, Embrapa, 2008.

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

TEZOTTO-ULIANA, J. V.; FARGONI, G. P.; GEERDINK, G. M.; KLUGE, R. A. Chitosan applications pre- or postharvest prolong raspberry shelf-lifequality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 91, p. 72-77, 2014.

TIAN, S. P.; CHAN, Z. L. Potential of induced resistance in postharvest disease control of fruits and vegetables. **Acta Phytopathology Sinica**, v. 34, p. 385-394, 2004.

TISI, A.; ANGELINI, R.; CONA, A. Wound healing in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 3, p. 204-206, 2008.

TUCCI, M.; RUOCCO, M.; DE MASI, L.; DE PALMA, M.; LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 341-354, 2011.

UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; LIU, X.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, v. 61, p. 165-179, 2013.

VIEIRA, W.A.S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.P.S. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1659, 2013.

WALTERS, D. R.; HAVIS, N. D.; PATERSON, L.; TAYLOR, J.; WALSH, D. J. Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley. **Plant Disease**, v. 95, p. 595–600, 2011.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115–180, 2012.

WIEN, H. C. The cucurbits: cucumber, melon, squash and pumpkin. In: WIEN, H.C. (Ed.). **The Physiology of Vegetable Crops**. Wallingford: CAB (Commonwealth Agricultural Bureaux) International, 1997. p. 345–386.

YANG, Y.L.; LIU, Z.Y.; CAI, L.; HYDE, K.D.; YU, Z.N.; MCKENZIE, E.H.C. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 123–146, 2009.

YANG, Y.; CAI, L.; YU, Z.; LIU, Z.; HYDE, K.D. *Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229–253, 2011.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and postharvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 253–262, 2005.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, p. 437–449, 2010.

ZHANG, P. Y.; WANG, J. C.; LIU, S. H.; CHEN, K. S. A novel burdock fructooligosaccharide induces changes in the production of salicylates, activates defense

enzymes and induces systemic acquired resistance to *Colletotrichum orbiculare* cucumber seedlings. *Journal of Phytopathology*, v. 157, p. 201-207, 2009.

ZHENG, X.; TIAN, S.; GIDLEY, M. J.; YUE, H.; LI, B. Effects of exogenous oxalic acid on ripening and decay incidence in mango fruit during storage at room temperature. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 281–284, 2007a.

ZHENG, X.; TIAN, S.; MENG, X.; LI, B. Physiological and biochemical responses in peach fruit to oxalic acid treatment during storage at room temperature. **Food Chemistry**, v. 104, p. 156-162, 2007b.

CAPÍTULO 2

Primeiro relato de *Colletotrichum brevisporum* causando antracnose em melão (*Cucumis melo* L.) no Brasil

RESUMO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) tem grande importância para a economia da Região Nordeste do Brasil, gerando emprego e renda e abastecendo o mercado nacional e internacional. A antracnose é uma doença que ataca os frutos de melão, sobretudo na pós-colheita. A doença é causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, gênero de distribuição mundial e significativa importância como fitopatógeno. Recentemente, foi considerado um dos dez mais importantes do mundo, devido aos prejuízos que causa a agricultura, ao grande número de espécies do gênero e ao fato de uma mesma espécie do patógeno poder colonizar mais de um hospedeiro. A identificação precisa do patógeno e a sua associação correta com uma determinada espécie vegetal e com cultivares específicas da cultura se constituem em passos importantes para um manejo adequado da doença. A partir de um isolado de *Colletotrichum* sp. causador de antracnose em chuchu cedido pela Embrapa Hortaliças – DF/Brasil, foi testada a patogenicidade do mesmo em frutos de melão (*Cucumis melo* L.) de quatro cultivares comerciais e em frutos de uma população resultante de quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro CECA/UFAL. O isolado se mostrou patogênico para três cultivares comerciais e nos frutos do Programa de melhoramento. O isolado foi caracterizado morfológica e molecularmente como sendo pertencente à espécie *Colletotrichum brevisporum*, através da comparação dos caracteres morfológicos com os descritos na literatura e da análise molecular de seis marcadores genéticos: actina (ACT); β -tubulina (TUB2); calmodulina (CAL); quitina sintetase (CHS I); gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPDH) e espaçador interno transcrito do rDNA (ITS). Sendo este o primeiro relato da relação patógeno-hospedeiro entre *C. brevisporum* e *C. melo* no mundo.

Palavras-chave: filogenia, antracnose, melão, cultivares.

ABSTRACT

The melon crop (*Cucumis melo* L.) has great importance for the economy of northeastern Brazil, generating jobs and income and fueling the domestic and international markets. Anthracnose is a disease that attacks the fruits of melon, particularly in post-harvest. The disease is caused by fungi of the genus *Colletotrichum*, worldwide distribution of gender and significant importance as a pathogen. Recently, it was considered one of the ten most important in the world because of the damage it causes to agriculture, the large number of species of the genus and the fact that the same species of the pathogen colonizing power over a host. The precise identification of the pathogen and its correct association with a specific plant species and cultivars specific culture constitute important steps for proper management of the disease. From an isolated *Colletotrichum* sp. anthracnose-causing in chayote donated by Embrapa Vegetables DF / Brazil, it tested the pathogenicity of the same fruits in melon (*Cucumis melo* L.) of four commercial cultivars and fruit of a population resulting from mass selection cycle of PM1 population the Genetic Improvement Program Melon plant CECA / UFAL. Isolated proved pathogenic for three commercial cultivars and fruit improvement program. The isolate was characterized morphologically and molecularly as belonging to the species *Colletotrichum brevisporum*, by comparing the morphological characters with those described in the literature and molecular analysis of six genetic markers: actin (ACT); β -tubulin (TUB2); calmodulin (CAL); chitin synthase (CHS I); glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) and rDNA internal transcribed spacer (ITS). This being the first report of the host-pathogen relationship between *C. brevisporum* and *C. melo* in the world.

Keywords: phylogeny, anthracnose, melon, cultivars.

Introdução

A cultura do melão representa uma importante fonte de emprego e renda para o Brasil, onde em 2012 foram produzidas 675.386 toneladas, numa área plantada de 22.789 hectares e gerando um valor de R\$ 476.676, 00. O Nordeste é o maior produtor da fruta sendo responsável por R\$ 440.383,00 deste total e com uma área plantada de 19.866 hectares (IBGE, 2012). A cultura apresenta diferenças marcantes na susceptibilidade a doenças dentre as várias cultivares e isso se deve ao grande *pool* gênico presente nas sete variedades botânicas existentes de melão e nos seus diversos híbridos (MUNGER; ROBINSON, 1991).

Apesar do sucesso dessa cultura no agronegócio, diversas doenças acometem a cultura e diminuem a produtividade, causando prejuízos, tanto na pré-colheita quanto na pós-colheita. Dentre os agentes causadores de doenças, destacam-se os fungos como os principais causadores de perdas na pós-colheita (TERAO et al., 2008).

As podridões, no pós-colheita, representam um grande problema para diversas hortaliças. Dentre as podridões, estão as antracoses, causadas por *Colletotrichum* sp.. A espécie *C. orbiculare* (sin. *Colletotrichum lagenarium*), causa antracnose em meloeiro e *Colletotrichum magna* causa antracnose em melancia e em pepino (REDMAN et al., 1999). As espécies do gênero *Colletotrichum* se caracterizam por colonizar diversos hospedeiros diferentes e isto é um dos fatores que torna complexa a sua taxonomia (CAI et al., 2009; YANG et al., 2011; NOIREUNG et al., 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013; UDAYANGA et al., 2013; PAUL et al., 2014). Recentemente, *Colletotrichum brevisporum* foi associado com frutos de mamão (*Carica papaya*), sendo originalmente descrito na Tailândia causando antracnose na Bromeliaceae *Neoregelia* sp. e na Pandanaceae *Pandanus pygmaeus*, espécies de plantas ornamentais (VIEIRA et al., 2013).

Diversos marcadores genéticos têm sido utilizados na construção de árvores filogenéticas baseadas nas comparações de, sequências de nucleotídeos, uma vez que dados de morfologia não são suficientes para caracterizar as espécies do gênero *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012; DAMM; CANNON; LIU et al., 2013; LIU et al., 2014). Dentre os marcadores utilizados estão gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sequência parcial da actina (ACT), quitina sintetase 1 (CHS-1), beta-tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetase (GS) e espaçador interno transcrito (ITS) (DAMM et al., 2012; PAUL et al., 2014; LIU et al., 2014).

Neste trabalho, um isolado de ascomiceto causador de antracnose em chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) (Cucurbitaceae) proveniente de Antônio Carlos – SC e cedido pela Embrapa-Hortaliças/DF foi caracterizado morfológica e molecularmente, caracterizado como sendo *Colletotrichum brevisporum*, o que representa o primeiro relato dessa espécie causando antracnose em melão e em Cucurbitaceae., Além disso, foi testada a patogenicidade do fungo em relação a quatro cultivares comerciais de melão e uma população resultante do quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro CECA/UFAL. Cultivares diferentes podem apresentar níveis de susceptibilidade distintas e por isso, foram testadas neste trabalho as cultivares comerciais Valenciano, Grand Prix (Pele-de-sapo), Orange Flesh e Acclaim, para caracteriza-las quanto à susceptibilidade ao fungo, sendo essa triagem importante etapa na elaboração de estratégias para controlar o patógeno, visando ajustar as condições às características de cada genótipo (BI et al., 2010; WALTERS; RATSET; HAVIS., 2013).

Material e métodos

Localização: Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Molecular e no Laboratório de Fitopatologia, ambos pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) localizado em Rio Largo – Alagoas.

Isolados fúngicos: Um total de cinco isolados de fungos causadores de podridões em cucurbitáceas foram recebidos da micoteca da Embrapa Hortaliças – Brasília –DF, gentilmente cedidos pelo Dr. Ailton Reis. Os isolados foram mantidos em meio BDA Sintético (adquirido da Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA). Destes, o isolado denominado Coll 73 foi utilizado neste estudo.

Caracterização morfológica e cultural: O isolado Coll 73 foi cultivado por sete dias em meio BDA sintético, onde a colônia foi caracterizada em sua morfologia e fotografada. A taxa de crescimento do fungo foi mensurada através de medição (em milímetros) dos eixos ortogonais das colônias de cinco placas com meio BDA sintético ao longo de sete dias. O

repique inicial das cinco placas consistiu de discos de micélio retirados da borda de crescimento ativo da colônia de uma placa previamente preparada.

Extração de DNA e PCR (*Polimerase Chain Reaction*): O DNA total foi extraído segundo protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). A reação de PCR foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) num volume total de 30 µl. As PCRs amplificaram os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), quitina sintetase (CHS-1), β-tubulina (TUB2), aquitina (ACT), calmodulina (CAL) e espaçador interno transcrito (ITS). Cada reação foi constituída por 1 µl do DNA genômico, 0,2 µM de cada primer, 1x Tampão PCR, 2 mM de MgCl₂, 20 µM de cada dNTP, 0,25 U de Taq DNA polimerase. A amplificação dos marcadores genéticos do Espaçador Interno Transcrito das unidades de repetição do rDNA. ITS 1 (GARDES; BRUNS, 1993) e ITS 4 (WHITE et al., 1990), do isolado fúngico, foi feita através de 38 ciclos de reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), segundo as seguintes condições: 95 °C (2 min); 95 °C (1 min); 55 °C (0,30 min); 72 °C (0,45 min) e 72 °C (10 min). A reação de PCR para amplificar o gene Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada em 35 ciclos, segundo o seguinte protocolo: 95 °C (4 min); 95 °C (0,30 min); 60 °C (0,30 min); 72 °C (0,45 min) e 72 °C (7 min). Os amplicons foram corados com brometo de etídeo, visualizados em gel de agarose a 1,5% e fotografados.

Sequenciamento e análises filogenéticas: Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na Macrogen, Seoul, South Korea. O sequenciamento foi realizado em ambas as direções. As sequências dos produtos de PCR dos seis marcadores genéticos, foram comparadas com as de outras espécies do gênero *Colletotrichum* disponíveis no *Genbank*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para a construção de árvore filogenética multilocus. Foi utilizado o método de máxima verossimilhança no programa RaxML, assumindo o modelo *general time reversible* (GTR) para substituição de nucleotídeos, com distribuição GAMMA da taxa de heterogeneidade. As sequências utilizadas para a construção da árvore filogenética, são descritas a seguir com os seus respectivos números de acesso: *C. brevisporum* BCC 38876 (LIU et al., 2014); *C. brevisporum* BTL23 LC0870 (NOIREUNG et al., 2012); *C. cliviae* CBS 125375 (LIU et al., 2013); *C. cliviae* CMM3742 (VIEIRA et al., 2013); *C. cliviae* CMM3746 (VIEIRA et al., 2013); ; *C. cliviae* CMM3808 (VIEIRA et al., 2013);; *C. exelsum* CGMCC 3.15130 (TAO et al., 2013); *C. tropicicola* BTL07 LC0957 (NOIREUNG, et al., 2012); *C. tropicicola* L58 LC0598 (NOIREUNG et al., 2012); *C.*

dracaenophilum CBS 118199 (LIU et al., 2013); *C. yunnanense* CBS 132135 (CANNON et al., 2012) e como *outgroup*, *C. boninense* CBS 123755 (DAMM et al., 2012).

Testes de patogenicidade em diferentes cultivares de melão A patogenicidade dos cinco isolados, foi testada em frutos de quatro cultivares comerciais de melão Valenciano, Grand Prix (Sakata Seed Corporation) , Acclaim (Syngenta AG) e Orange Flesh (Sakata Seed Corporation) e em frutos do quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro do CECA/UFAL. Os frutos foram feridos na região mediana, com agulha de seringa para insulina a uma profundidade de 3 mm. Discos de micélio retirados a partir da margem de colônias crescendo ativamente em BDA do isolado foram colocados sobre as feridas. Discos de BDA sem o crescimento de fungos foram utilizados como controle. Os frutos inoculados foram mantidas em câmara úmida durante 2 dias a 25 ° C. A avaliação foi realizada após seis dias.

Resultados e Discussão

A partir de cinco isolados cedidos pela micoteca da Embrapa Hortaliças/ DF, um destes isolados (Coll 73) foi identificado como sendo causador de antracnose em melões de forma mais severa que os demais. Este isolado foi caracterizado morfológica e molecularmente.

Caracterização morfológica e cultural

O isolado Coll 73, quando mantido em meio BDA a 25°C por sete dias, apresentou colônia com os seguintes aspectos: micélio aéreo cotonoso, branco, e no verso, coloração bege escuro no centro com bordas mais claras. Apresentou crescimento concêntrico e não apresentou setores (Figura 1-A e B). Estas características se assemelham a algumas das descritas em outros trabalhos utilizando meio BDA. Noireung et al. (2012) descreveram o holótipo da espécie na Tailândia, como apresentando “micélio aéreo em pequenos tufo, branco, esparso, com massas de conídios e o reverso verde escuro”. Já no relato feito por Paul et al. (2014), os autores descrevem a colônia da seguinte maneira: “micélio branco em pequenos tufo e reverso escuro no centro”. Vieira et al., (2013) descreveram a colônia de *C.*

brevisporum da seguinte maneira: “colônias variaram entre esbranquiçada e marrom claro no reverso, com massa de conídios laranja”.

As diferenças nos aspectos morfológicos das colônias de *Colletotrichum* spp., especialmente no que se refere a cor, é um dos principais motivos para a sistemática do gênero não ser possível apenas com base em dados morfológicos (WIKKEE et al., 2011, CANNON et al., 2012; DAMM et al., 2012; O’CONNELL et al., 2012; LIU et al., 2014). Estas diferenças se devem aos genótipos dos isolados serem constituídos por indivíduos que acumularam algumas mutações distintas e a pequenas diferenças no ambiente onde o patógeno se desenvolveu, por exemplo, temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

Com relação aos esporos, o isolado Coll 73 produziu poucos esporos nas condições testadas, que incluíram, meio BDA, meio SNA (do inglês, *synthetic low-nutrient agar*), meio de aveia e microcultura. Os poucos esporos conseguidos foram provenientes de microcultura e apresentaram conídios hialinos, não septados, com formato cilíndrico, extremidades arredondadas, ligeiramente achatado e com parede lisa (Figura 1-C e D). Cinquenta apressórios obtidos em microcultura tiveram as seguintes dimensões, comprimento médio de 5,69 (3,32 a 8,62) μm e 3,97 (2,43 a 5,42) μm de largura, e com uma razão de comprimento médio por largura média de 1,43 (Figura 1-E e F). Os formatos foram variáveis, podendo ser ovoides, clavados ou ligeiramente irregulares, observou-se coloração marrom clara nas bordas, com o centro variando entre marrom claro, marrom escuro e violeta (Figura 1- E e F). Os formatos dos apressórios do isolado Coll 73, coincidiram com os encontrados por Noireung et al. (2012) e por Paul et al. (2014), embora a descrição da coloração tenha variado um pouco. Quanto às dimensões, os valores encontrados por Noireung et al. (2012) foram $10\text{--}13 \times 8\text{--}11 \mu\text{m}$ ($= 11.3 \pm 1.5 \times 9.8 \pm 4.4$, $n = 10$) e os encontrados por Paul et al. (2014) foram $10\text{--}16.8 \times 5\text{--}9.4$, o que difere dos encontrados no presente trabalho.

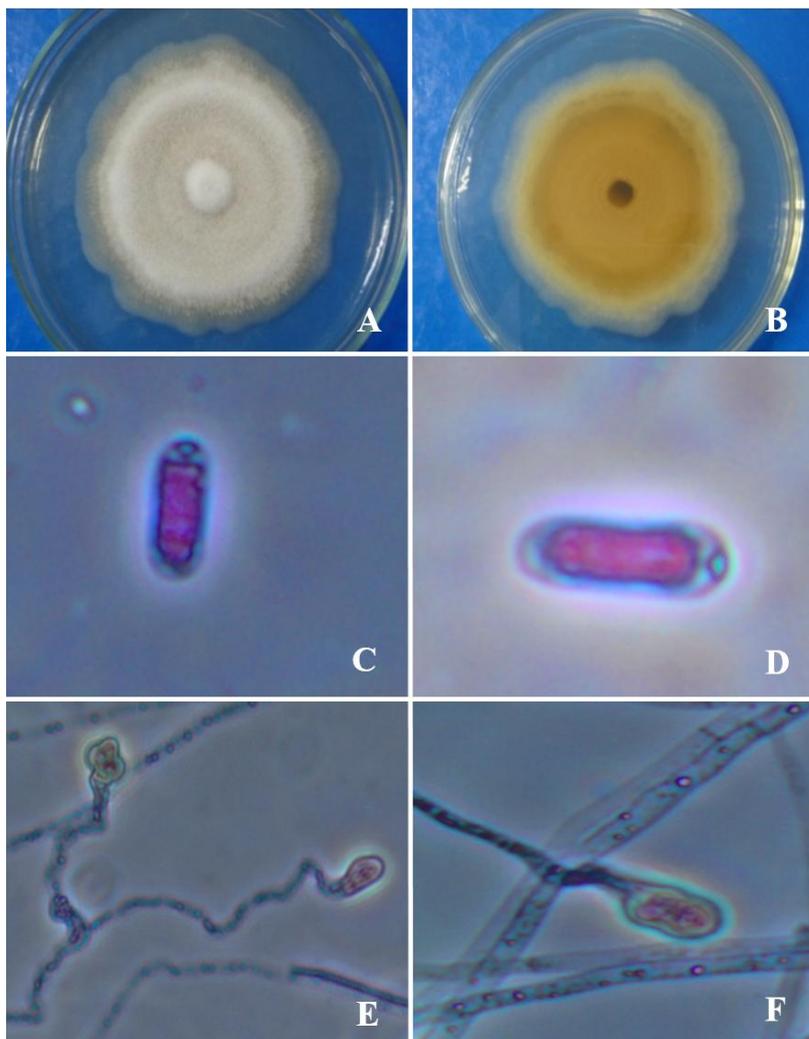


Figura 1. Aspectos culturais e morfológicos de *Colletotrichum brevisporum*: Crescimento micelial em meio BDA sintético, após sete dias, visão superior (A) e reversa (B); conídios (C e D); e apressórios (E e F).

O fungo apresentou uma média de crescimento diário de 6,61 mm, quando crescido em meio BDA a temperatura de 25°C e com fotoperíodo de 12 h de luz fluorescente (Figura 2). Essa taxa de crescimento difere da encontrada por Noireung et al. (2012) a 27°C (8,5 mm/dia), é um pouco menor do que a de *C. tropicicola* a 27°C que teve a média de 6,9 mm/dia e é maior do que a de *C. thailandicum* que foi estimada 6,0 mm/dia. Sabe-se que as diferenças nas temperaturas de cultivo influenciam na taxa de crescimento (PHOTITA et al., 2005). Para as espécies: *C. gloeosporioides*, 9,3 a 25°C e 9,9 mm/dia a 30°C; *C. musae*, 12,6 a 25°C e 12,5 mm/dia a 30°C; *C. truncatum* 7,1 a 25°C e 7,4 mm/dia a 30°C (PHOTITA et al., 2005). Dessa forma, o isolado de *C. brevisporum* utilizado neste trabalho, apresenta taxas de crescimento mais próximas às de *C. truncatum*, quando comparadas às taxas dentro da mesma

temperatura de crescimento. Quando comparada com a taxa de crescimento da espécie proximamente relacionada *C. cliviae* (15,6 mm/dia) (YANG et al., 2009), a taxa de crescimento de *C. brevisporum* é bem baixa.

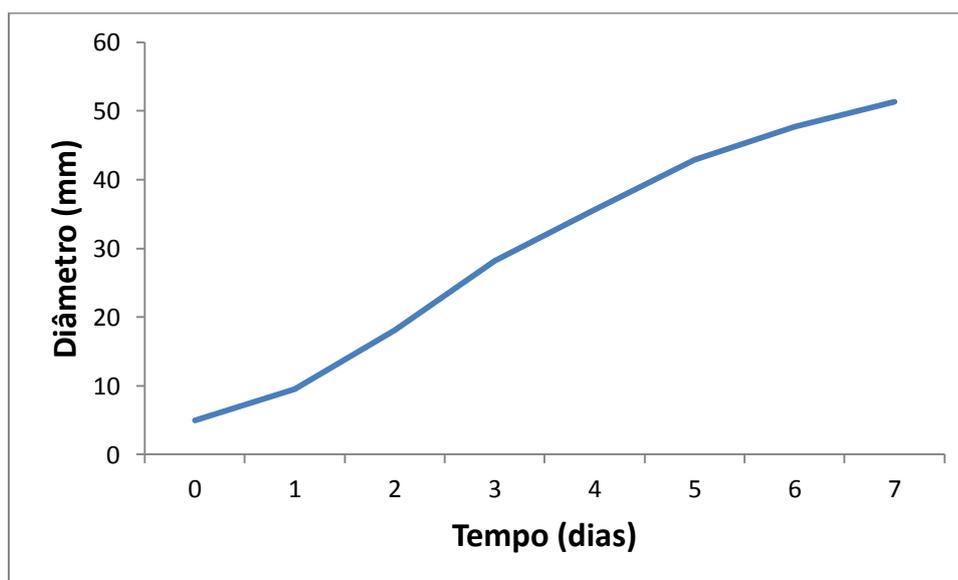


Figura 2. Curva de crescimento micelial de *Collethotrichum brevisporum* em meio BDA sintético. Os valores representam a média de cinco repetições.

Análise filogenética

O isolado Coll 73, proveniente de Curcubitáceas, foi identificado filogeneticamente como *Colletotrichum brevisporum* (Figura 4). Na Figura 4 o Coll 73 aparece como JP73. Nesta análise, foram utilizados seis marcadores genéticos, o que comprovou que o isolado Coll 73 é *Colletotrichum brevisporum* e que este se agrupa no mesmo clado de *C. cliviae*. Sendo assim, a mesma espécie descrita por Noireung et al., em 2012 (holótipo). *Colletotrichum brevisporum* foi originalmente descrita na Tailândia causando antracnose na Bromeliaceae *Neoregelia* sp. e na Pandanaceae *Pandanus pygmaeus*, ambas espécies ornamentais (NOIREUNG et al., 2012). A espécie foi depois descrita em mamão (*Carica papaya* L.) por Vieira et al. (2013) no Brasil, posteriormente descrita colonizando a planta

medicinal chinesa *Lycium chinense* Mill, na Coreia do Sul (PAUL et al., 2014), e em melão neste trabalho.

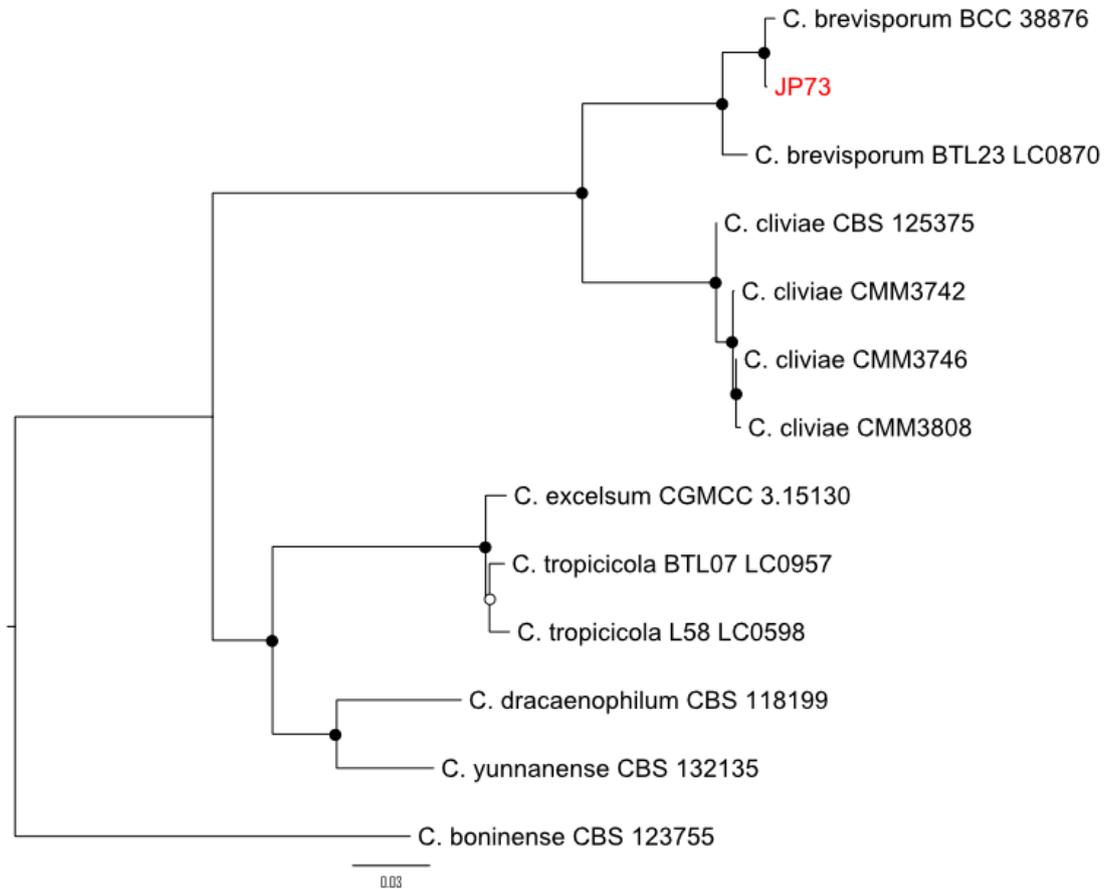


Figura 3. Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança e construída com parcimônia máxima utilizando análise combinada de seis marcadores genéticos (ITS, GAPDH, TUB2, CHS-1, ACT e CAL). Utilizada para identificar *Colletotrichum brevisporum* (JP73). *C. boninense* funcionou como *outgroup*. Foi utilizado o método de máxima verossimilhança no programa RaxML, assumindo o modelo *general time reversible* (GTR) para substituição de nucleotídeos, com distribuição GAMMA da taxa de heterogeneidade.

Na árvore filogenética elaborada por Noireung et al. (2012), foi verificado que *C. brevisporum* se agrupa com *C. tropicicola* e com *C. cliviae* em um clado moderadamente suportado, sendo cada um deles, baseado em linhagens bem suportadas. Os autores basearam as suas análises moleculares em sequenciamento parcial do gene da actina (ACT), da β -tubulina (TUB2) e da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Vieira et al.

(2013) encontraram *C. brevisporum* em frutos de mamão e identificaram o patógeno através de análises de comparações de sequências parciais dos marcadores de DNA, ACT, ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Já Paul et al. (2014) construiu a árvore filogenética se baseando na análise das sequências dos marcadores genéticos ITS, GADPH e ACT para identificar *C. brevisporum*.

A análise filogenética realizada no presente trabalho teve como base as sequências de seis marcadores genéticos (ITS, GADPH, CAL, TUB2, ACT e CHS), o que torna bastante robusta a identificação, uma vez que a análise multilocus soma as comparações das sequências dos vários *loci* envolvidos e, assim aproxima a árvore filogenética da verdadeira história evolutiva da espécie, diferentemente da análise de um único *locus*, na qual se corre o risco de estar analisando a evolução de um único gene e não de um organismo (CANNON et al., 2012; O'CONNELL et al., 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013).

Testes de patogenicidade de *C. brevisporum* em relação a cultivares de melão

No ensaio para testar a patogenicidade de *C. brevisporum* em quatro cultivares comerciais de melão (Valenciano, Grand Prix, Acclaim e Orange Flesh) e em melões em frutos do quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro (PMGM) do CECA/UFAL, foi constatado que *C. brevisporum* é capaz de produzir sintomas de antracnose em todas as cultivares comerciais testadas, exceto na cultivar Grand Prix, como exemplificado na Figura 3. O patógeno também produziu a doença em frutos e folhas de plantas do quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro do PMGM, CECA/UFAL (Figura 3D).

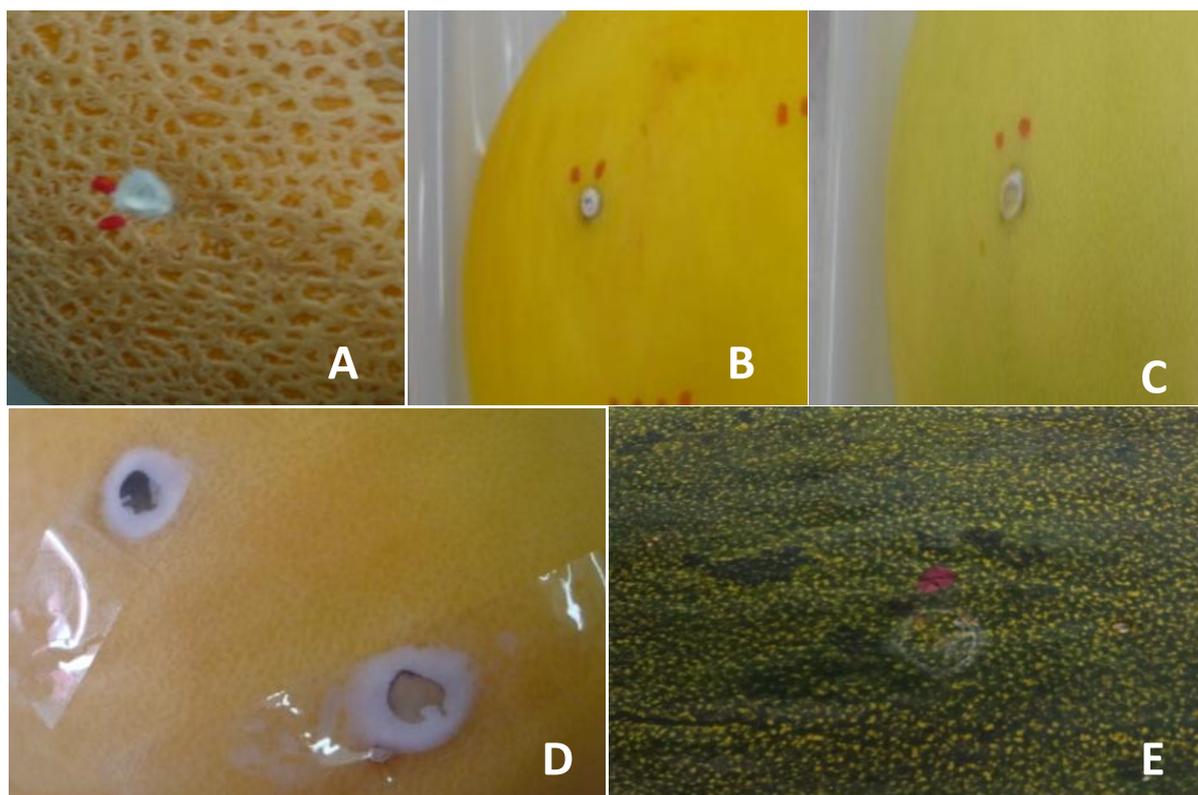


Figura 4. Testes de patogenicidade de *Colletotrichum brevisporum* em relação às cultivares comerciais, Acclaim (A), Valenciano (B), Orange Flesh (C), a em frutos do quarto ciclo de seleção massal da população PM1 do Programa de Melhoramento Genético do Meloeiro do CECA/UFAL, (D) e Grand Prix (E).

É interessante o fato da diversidade de hospedeiros que espécies deste gênero podem colonizar (CAI et al., 2009). Os resultados do presente trabalho, reforçam o conhecimento sobre a gama de espécies vegetais atacadas pelo gênero *Colletotrichum*. Assim, este é o primeiro relato da espécie *C. brevisporum* colonizando meloeiro.

Conclusão

Este é o primeiro relato de *C. brevisporum* colonizando meloeiro. Existem diferenças genéticas em relação à susceptibilidade das cultivares de melão aqui testadas quanto a ação de *C. brevisporum*.

Referências bibliográficas

BI, Y.; LI, Y.; GE, Y.; WANG, Y. Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases. In: PRUSKY, D.; M. L. GULLINO (Eds.). *Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, 2010. v. 2, p. 31-41.

CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; WALLER, J. M.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R. G.; MCKENZIE, E. H. C.; JOHNSTON, P. R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 183-204, 2009.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, 2013.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Planejamento da Presidência da República. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em 28 de setembro de 2014.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113-118, 1993.

Genbank, NCBI. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em 17 de janeiro de 2015.

LIU, F; CAI, L.; CROUS, P. W.; DAMM, U. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 844-860, 2013.

LIU, F; CAI, L.; CROUS, P. W.; DAMM, U. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, v. 33, p. 83-97, 2014.

MUNGER, H. M.; ROBINSON, R. W. Nomenclature of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetics Cooperative Report**, v. 14, p. 43-44 (article 14), 1991.

NOIREUNG, P.; PHOULIVONG, S.; LIU, F; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; JONES, E.B.G.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K.D. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, n. 3, Numero special Coelomycetes, p. 347-362, 2012.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N.; ALTMULLER, J.; ALVARADO-BALDERRAMA, L.; BAUSER, C. A.; BECKER, C.; BIRREN, B. W.; CHEN, Z.; CHOI, J.; CROUCH, J. A.; DUVIC, J. P.; FARMAN, M. A.; GAN, P.; HEIMAN, D.; HENRISSAT, B.; HOWARD, R. J.; KABBAGE, M.; KOCH, C.; KRACHER, B.; KUBO, Y., LAW, A. D.; LEBRUN, M. H.; LEE., Y. H.; MIYARA, I.; MOORE, N.; NEUMANN, U.; NORDSTROM, K.; PANACCIONE, D. G.; PANSTRUGA, R.; PLACE, M.; PROCTOR, R. H.; PRUSKY, D.; RECH, G.; REINHARDT, R.; ROLLINS, J.A.; ROUNSLEY, S.; SCHARDL, C. L.; SCHWARTZ, D. C.; SHENOY, N.; SHIRASU, K.; SIKHAKOLLI, U. R.; STUBER, K.; SUKNO, S. A.; SWEIGARD, J. A.; TAKANO, Y.; TAKAHARA, H.; TRAIL, F.; van der DOES, H. C.; VOLL, L. M.; WILL, I.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, S.; DICKMAN, M. B.; SCHULZE-LEFERT, P.; van THEMAAT, E. V. L.; MA, L. J.; VAILLANCOURT, L. J. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9. 1060-1067, 2012.

PAUL, N. C.; LEE, H. B.; LEE, J. H.; SHIN, K. S.; RYU, T. H.; KWON, H. R.; KIM, Y. K.; YOUN, Y. N.; YU, S. H. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 15272-15286, 2014.

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J.; FORD, R.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.

REDMAN, R. S.; FREEMAN, S.; CLIFTON, D. R., MORREL, J.; BROWN, G.; RODRIGUEZ, R. J. Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, v. 119, p. 795-804, 1999.

TAO, G.; LIU, Z. Y.; LIU, F.; GAO, Y. H.; CAI, L. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 139-164, 2013.

TERAO, D.; OLIVEIRA, S. M. A.; VIANA, F. M. P.; SARAIVA, A. C. M. Estratégias de controle de podridões em pós-colheita de melão: uma revisão. **Documentos Embrapa**, 112, 1677-1915, 2008.

UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; LIU, X.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? **Fungal Diversity**, v. 61, p. 165-179, 2013.

VIEIRA, W.A.S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.P.S. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1659, 2013.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 115-180, 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WIKEE, S.; CAI, L.; NOIREUNG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; SU, Y. Y.; CHUKEATIROTE, E.; THI, H. N.; BAHKALI, A. H.; MOSLEM, M. A.; ABDELSALAM, K.; HYDE, K. D. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). **Fungal Diversity**, v. 46, p. 171-182, 2011.

YANG, Y. L.; LIU, Z. Y.; CAI, L.; HYDE, K.D.; YU, Z. N.; MCKENZIE, E. H. C. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 123-146, 2009.

YANG, Y.; CAI, L.; YU, Z.; LIU, Z.; HYDE, K.D. *Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 32, n. 3, p. 229-253, 2011.

CAPÍTULO 3

**Uso de dióxido de silício e silicato de sódio no controle de
antracnose na pós-colheita de melão**

RESUMO

A cultura do melão tem grande importância na economia da Região Nordeste do Brasil. Dentre as cultivares da fruta produzidas na Região, as do grupo *Cantalupensis* e seus híbridos se destacam como as mais nobres e mais procuradas pelo mercado internacional, por terem sabor e aroma de qualidade superior. No entanto, são particularmente susceptíveis a determinados patógenos em pós-colheita, dentre eles *Colletotrichum* spp., fungos causadores de antracnose em diversas cucurbitáceas. A taxonomia do gênero *Colletotrichum* é complexa, considerando-se que espécies diferentes podem atacar o mesmo hospedeiro. Um desses casos, é o de *Colletotrichum brevisporum*, originalmente descrito na Tailândia, na Bromeliaceae *Neoregalia* sp. e na Pandanaceae *Pandanus pygmaeus*, e agora, com os resultados de nosso grupo de pesquisa, também em melão (dados não publicados). Atualmente existe uma preocupação por parte dos consumidores e das autoridades dos países importadores, com a contaminação dos alimentos por pesticidas. Nesse sentido, pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de controlar doenças com métodos alternativos. Nesse contexto, compostos à base de silício (Si) vêm se destacando como opção viável para controlar patógenos, considerando-se o fato de que vários desses compostos são classificados como seguros para o consumo humano. Neste trabalho foram testados silicato de sódio (Na_2SiO_3) e dióxido de silício (SiO_2), *in vitro* (25, 50, 100 e 200 mM), no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum brevisporum* e o pH dos meios de cultura acrescidos dos compostos de silício foi medido. Foram testados silicato de sódio (Na_2SiO_3) e dióxido de silício (SiO_2), *in vivo* (100 e 200 mM), no controle da antracnose, em frutos de melão da Cultivar Acclaim (Syngenta). Os resultados mostraram que o silicato de sódio, nas concentrações de 100 e 200 mM, inibiu totalmente o crescimento micelial de *Colletotrichum brevisporum*, *in vitro*, que o silicato de sódio, a 200 mM, reduziu a severidade da antracnose em frutos de melão Acclaim, em 37,12%. Os compostos de silício, aqui testados, não pareceram induzir resistência em melões Acclaim, antes, sim, exerceram efeito direto sobre o patógeno, devido ao aumento do pH produzido pelo NaSiO_3 .

Palavras-chave: *Cucumis melo*; *Colletotrichum brevisporum*; silício; indução de resistência.

ABSTRACT

The melon crop is of great importance in the economy of northeastern Brazil. Among the fruit cultivars produced in the region, the Cantalupensis the group and their hybrids stand out as the finest and most sought after by the international market because they taste and superior aroma. However, they are particularly susceptible to particular pathogens in post-harvest, including *Colletotrichum* spp., Causative fungi of anthracnose on various cucurbits. The *Colletotrichum* genus taxonomy is complex, given that different species can attack the same host. One such case is that of *Colletotrichum brevisporum* originally described in Thailand, Bromeliaceae *Neoregalia* sp. and Pandanaceae *Pandanus pygmaeus*, and now, with the results of our research group, also in melon (unpublished data). Currently there is a concern on the part of consumers and authorities in importing countries, with food contamination by pesticides. Accordingly, studies have been conducted with the aim of controlling diseases with alternative methods. In this context, compounds based on silicon (Si) are emerging as viable option for controlling pathogens, considering the fact that many of these compounds are classified as safe for human consumption. In this study we tested the sodium silicate (Na_2SiO_3) and silicon dioxide (SiO_2) in vitro (25, 50, 100 and 200 mM) in the control of mycelial growth of *Colletotrichum brevisporum* and the pH of the culture medium plus the compounds silicon was measured. Sodium silicate were tested (Na_2SiO_3) and silicon dioxide (SiO_2) in vivo (100 and 200 mM) in the control of anthracnose in melon fruits of cultivating Acclaim (Syngenta). The results showed that sodium silicate in concentrations of 100 and 200 mM completely inhibited mycelial growth of *Colletotrichum brevisporum in vitro*, that the sodium silicate, 200 mM decreased the severity of anthracnose on Acclaim melon fruit, at 37.12%, silicon compounds, tested here, did not appear to induce resistance in Acclaim melons before, yes, exerted direct effect on the pathogen, due to increased pH produced by Na_2SiO_3 .

Keywords: *Cucumis melo*; *Colletotrichum brevisporum*; silicon; resistance induction.

Introdução

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) é uma importante fonte de renda para a Região do Semi-Árido do Nordeste brasileiro. No ano de 2012 o volume produzido do fruto atingiu 675.386 toneladas e gerou um valor de R\$ 476.676, 00 (IBGE, 2012). Neste contexto, a qualidade dos frutos é uma preocupação constante por parte dos produtores, num mercado voltado, em grande parte, para a exportação. Para conservar os frutos na pós-colheita, alguns parâmetros de qualidade devem ser observados, dentre eles estão firmeza de polpa, aparência externa e perda de massa (AROUCHA et al., 2009; AROUCHA et al., 2012). Além disso, os consumidores estão cada vez mais exigentes com relação à contaminação dos alimentos por agrotóxicos, o que leva os pesquisadores a buscarem tratamentos alternativos aos convencionais para o controle de doenças.

Apesar do grande volume produzido, inúmeros patógenos de pós-colheita atacam os frutos e causam perdas significativas, sobretudo no grupo *cantaloupensis*. Os melões desse grupo são bastante perecíveis após a colheita, necessitando de refrigeração e de tratamento químico com fungicidas sintéticos (BI et al., 2010).

Dentre os patógenos que atacam na pós-colheita, está o *Colletotrichum orbiculare*, agente causal da antracnose. Essa espécie é a principal causadora dessa doença em cucurbitáceas. No entanto, uma das características do gênero *Colletotrichum* é de que algumas espécies são capazes de colonizar diversos hospedeiros distintos (CANNON et al., 2012; WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012; DAMM; CANNON; LIU, 2013). Uma das espécies do gênero que se enquadra nessa característica é *Colletotrichum brevisporum*, recentemente descrita como agente causal de antracnose na Bromeliaceae *Neoregelia* sp. e na Pandanaceae *Pandanus pygmaeus*, ambas espécies ornamentais (NOIREUNG et al., 2012). Depois, foi descrita em mamão (*Carica papaya*) (VIEIRA et al., 2013), na planta vinha de matrimônio (*Lycium chinense*), na Coreia do Sul (PAUL et al., 2014), e, mais recentemente, pelo nosso grupo de pesquisa, colonizando frutos de melão (dados não publicados).

Várias estratégias diferentes têm sido empregadas no controle alternativo das doenças de planta, incluindo métodos físicos (temperatura, radiação ultra-violeta, raios X), agentes químicos, como acibenzolar (SMITH-BECKER et al., 2003) e compostos de silício (GUO et al., 2007; LI et al., 2012). Essas estratégias têm por objetivo ativar a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (BI et al., 2010). Os agentes empregados nesse tipo de controle reduzem a doença em percentuais que variam entre 20 a

85% (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Além da redução dos prejuízos causados pelo patógeno, tem-se um baixo impacto ambiental e baixos riscos à saúde humana.

Uma das abordagens que tem se mostrado promissora é a utilização de silício (Si). Este elemento químico representa 27,70% da litosfera e é o segundo mais abundante, depois do oxigênio (O). O Si é considerado biologicamente ativo e desencadeia uma rápida e mais extensa resposta das defesas naturais da planta (FAUTEAUX et al., 2005). Compostos de silício reduziram a severidade e incidência da podridão rosa, causada pelo fungo *Trichothecium roseum*, em frutos de melão (GUO et al., 2007, LI et al., 2012). O emprego de Si no controle da antracnose no pós-colheita de melão pode representar uma estratégia de controle da doença bastante interessante quando se considera o custo, aliado aos ganhos em termos de saúde humana e equilíbrio ambiental.

Este trabalho teve por objetivo testar o efeito de compostos de silício no controle da antracnose em pós-colheita de melão Acclaim. Para tal, foram testados *in vitro* os efeitos de quatro concentrações diferentes de dióxido de silício (SiO₂) e de silicato de sódio (Na₂SiO₃) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum brevisporum*, e *in vivo* os efeitos de duas concentrações diferentes de dióxido de silício (SiO₂) e de silicato de sódio (Na₂SiO₃) no controle da antracnose, causada por este patógeno, em frutos de melão.

Material e Métodos

Local de condução dos experimentos – Laboratório de Virologia e Fitopatologia Molecular e no Laboratório de Fitopatologia, ambos do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Patógeno – Isolado de *Colletotrichum brevisporum* proveniente da Embrapa- Hortaliças/DF foi mantido em meio BDA (Batata, dextrose e Ágar). Inóculo do patógeno foi preparado por subcultura do fungo em placas de BDA, que foram incubadas a 25 ° C por 8-10 dias.

Melões – Acclaim (Syngenta) adquiridos comercialmente.

Teste *in vitro* - Testes *in vitro* contra *C. brevisporum* (isolado Coll 73) foram conduzidos de acordo com o método de El Ghaouth et al. (1998). Dióxido de silício ou silicato de sódio foi adicionado ao meio BDA autoclavado, a concentrações finais de 25, 50, 100 e 200 mM, contendo Tween 80 a 0,01% (v/v). As placas do grupo controle continham somente uma

solução de Tween 80 a 0,01% (v/v). Os pHs dos meios de cultura com dióxido de silício e silicato de sódio nas concentrações mencionadas foram aferidos. No centro das placas foram inoculados discos de micélio de 5 mm de *C. brevisporum*, retirados a partir da região de crescimento ativo da colônia em meio BDA. Em seguida as placas foram incubadas a 25 ° C. A incubação foi mantida até que o patógeno cobrisse inteiramente as placas de Petri do controle. Os diâmetros do crescimento (eixos ortogonais) das placas tratadas com silício foram medidos. Cinco repetições foram feitas para cada composto químico, em cada concentração e cada repetição representada por uma placa de Petri. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (2 x 4) mais um tratamento adicional com cinco repetições. Foi efetuada a análise de variância e na comparação dos fatores com o controle foi utilizado o Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

Teste *in vivo* - Melões da Cultivar do grupo *cantalupensis* Acclaim (Syngenta), adquiridos comercialmente, foram selecionados pelo aspecto uniforme, desinfetados por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% e enxaguados em água destilada, por duas vezes. Depois, os frutos foram mergulhados, por 10 segundos, em suspensões de dióxido de silício ou em soluções de silicato de sódio, de 100 e 200 mM, contendo 0,01% (v/v) de Tween 80. Foram constituídos dois grupos controle, em um deles utilizando-se apenas água destilada e, no outro, água destilada mais Tween 80, a 0,01% (v/v). Os melões foram dispostos individualmente em bandejas plásticas e ficaram secando ao ar em condições de laboratório, a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h. Após esse período, em três áreas diferentes da superfície de cada fruto, produziram-se três orifícios, em cada, com profundidade de 3 ± 1 milímetros, em formato triangular, realizados com agulha de seringa para insulina esterilizada e sobre os quais foi inoculado o disco de micélio de *C. brevisporum*, crescido previamente em meio BDA, por oito a 10 dias. Em seguida, cada bandeja plástica com um fruto foi envolvida por saco plástico transparente umedecido, para se estabelecer uma câmara úmida. Os frutos permaneceram em temperatura ambiente ($29 \pm 2^\circ\text{C}$), por 48 h, após esse período, a câmara úmida foi desfeita. Os diâmetros das lesões causadas pelo crescimento do fungo foram medidos diariamente, por um período de sete dias. O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial (2 x 2) mais dois tratamentos adicionais, com quatro repetições. Foi efetuada a análise de variância, sendo que as médias das fontes de silício e de concentrações foram comparadas pelo Teste F no nível de 5% de

probabilidade e as das combinações dos fatores (fontes de silício e concentrações) foram comparadas com as duas testemunhas pelo Teste de Dunnett no nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Inibição do crescimento micelial *in vitro* – Para se estabelecer uma correlação entre a inibição do crescimento micelial *in vitro* com os pHs dos meios de cultura, após a adição de silicato de sódio ou dióxido de silício nas concentrações dos testes realizados neste trabalho, foram aferidos os valores de pH. Foram encontrados os seguintes valores: controle, 5,60; dióxido de silício 25 mM, 5,62; dióxido de silício 50 mM, 5,59; dióxido de silício 100 mM 5,58; dióxido de silício 200 mM, 5,58; silicato de sódio 25 mM, 10,56; silicato de sódio 50 mM, 11,62; silicato de sódio 100 mM, 12,36 e silicato de sódio 200 mM, 12,96. As placas do controle continham, além de BDA, somente Tween 80 a 0,01% (v/v).

Houve inibição total do crescimento micelial para *Colletotrichum brevisporum*, quando foi utilizado silicato de sódio nas concentrações de 100 e de 200 mM, sendo altamente significativas as diferenças, quando analisadas pelo Teste de Dunnett a 5% de probabilidade. O dióxido de silício não foi capaz de inibir significativamente o crescimento do patógeno, em qualquer das concentrações testadas (Tabela 1 e Figura 1). Na Tabela 1 encontram-se os resultados da análise de variância e coeficiente de variação do efeito de compostos de silício, em diferentes concentrações, sobre a inibição do crescimento micelial de *Coletotrichum brevisporum in vitro*. A interação entre os fatores compostos de silício e concentrações foi significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, indicando que o comportamento dos compostos de silício na inibição do crescimento micelial do referido fungo depende da concentração, o que anula os efeitos individuais de cada fator estudado. Também, houve diferença significativa entre os fatores *versus* controle pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade em relação à inibição do crescimento micelial de *Coletotrichum brevisporum*. O coeficiente de variação foi 11,43%, indicando boa precisão experimental segundo Ferreira (2000).

Os valores de pH encontrados para os meios de cultura (BDA) adicionados de dióxido de silício, variaram muito pouco (5,58 a 5,62) entre si e com relação ao do grupo controle (5,60). Além disso, todos esses valores se encontraram na faixa de pH ácido, o que é mais propício para o crescimento e multiplicação de fungos. Já os valores de pH encontrados nos

meios de cultura acrescidos de silicato de sódio variaram de 10,56 a 12,96, ficando todos eles na faixa alcalina. Os pHs dos meios acrescidos de silicato de sódio a 100 e 200 mM (12,36 e 12,96) representam valores elevados, que, certamente, interferem no desenvolvimento micelial do patógeno por se encontrarem numa faixa inadequada para o mesmo.

Este patógeno pode ser sensível, também, à desidratação provocada pela elevada concentração do sal, a exemplo do que acontece com *Hemileia vastatrix* em relação a silicato de potássio, que tem o efeito de sal (hidrófilo) que rouba água, e assim, impede o desenvolvimento das estruturas do fungo sobre a folha do cafeeiro (CARRÉ-MISSIO et al., 2014).

Tabela 1 - Análise de variância e coeficiente de variação do efeito de compostos de silício, em diferentes concentrações, sobre a inibição do crescimento micelial de *Coletotrichum brevisporum* *in vitro*.

Causa de variação	GL	SQ	QM	F
Fator 1 - Compostos	1	14.573,30625	14.573,30625	256,0339**
Fator 2 - Concentrações	3	20.306,81875	6.768,93958	118,9214**
Interação F1 x F2	3	18.827,96875	6.275,98958	110,2609**
Fatores x Controle	1	3.231,00625	3.231,00625	56,7645**
Tratamentos	8	56.939,10000	-	-
Resíduo	36	2.049,10000	56,91944	
Total	44	58.988,20000		
CV%	11,43			

** : Significativo no nível de 1% de probabilidade.

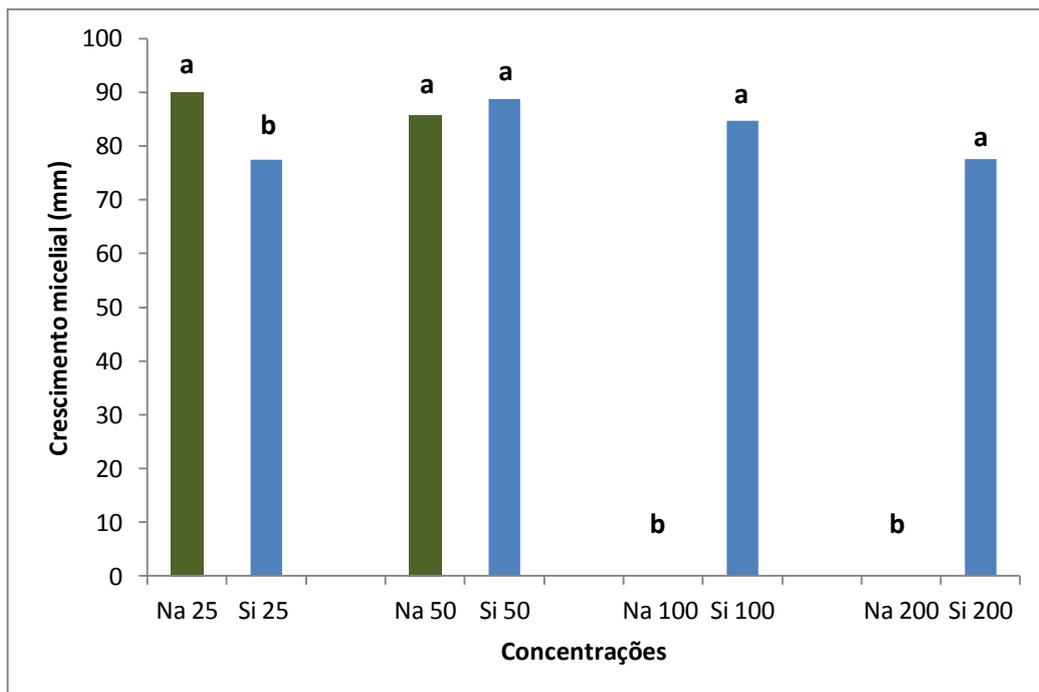


Figura 1 - Efeito de compostos de silício na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum brevisporum*, dentro de cada concentração. Compostos de silício: Na - silicato de sódio; e Si - dióxido de silício. Concentrações: 25, 50, 100 e 200 mM. As médias com letras diferentes, para cada concentração, indicam diferença significativa, pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

Na Figura 2, observa-se que os fatores Na 100 e Na 200 diferiram do controle pelo Teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

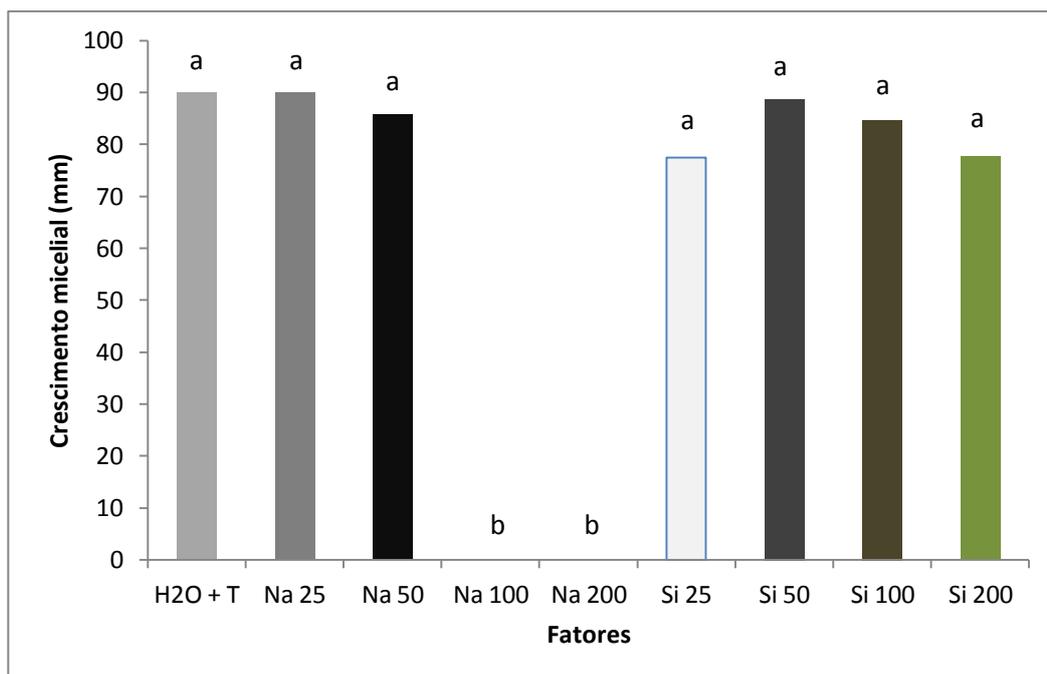


Figura 2 - Efeito dos fatores: compostos de silício e concentrações na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum brevisporum*. Compostos de silício: Na - silicato de sódio; e Si - dióxido de silício. Concentrações: 25, 50, 100 e 200 mM. Controle: H₂O+T - água mais Tween 80. As médias seguidas da mesma letra do Controle, em uma mesma coluna, não diferem entre si, conforme o Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (dms=13,30).

Teste *in vivo*

No ensaio para a determinação de indução de resistência *in vivo*, em frutos de melão da variedade Acclaim, foi verificado que o silicato de sódio, a 200 mM, é capaz de reduzir os diâmetros das lesões de antracnose provocadas por *C. brevisporum*, em 37,12%, quando comparado com o tratamento com água destilada (Controle H₂O: 26,375; Na 200mM: 16,585) (Tabela 2, Figuras 3, 4 e 5).

Tabela 2 – Análise de variância e coeficiente de variação do efeito de compostos de silício, em diferentes concentrações, sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim (Syngenta).

Causa de variação	GL	SQ	QM	F
Fator 1 - Compostos	1	21.78556	21.78556	1.0917 ns
Fator 2 - Concentrações	1	33.03376	33.03376	1.6554 ns
Interação F1 x F2	1	0.02641	0.02641	0.0013 ns
Fatores x Controles	1	91.65977	91.65977	4.5933 *
Controle 1 x Controle 2	1	72.00000	72.00000	3.6081 ns
Tratamentos	5	218.50549	43.70110	2.1900
Resíduo	18	359.18878	19.95493	
Total	23	577.64926		
CV%				21,67

Fv: fonte de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; F: teste F. Ns: não significativo ($p \geq 0.05$); *: significativo no nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p \leq 0.05$).

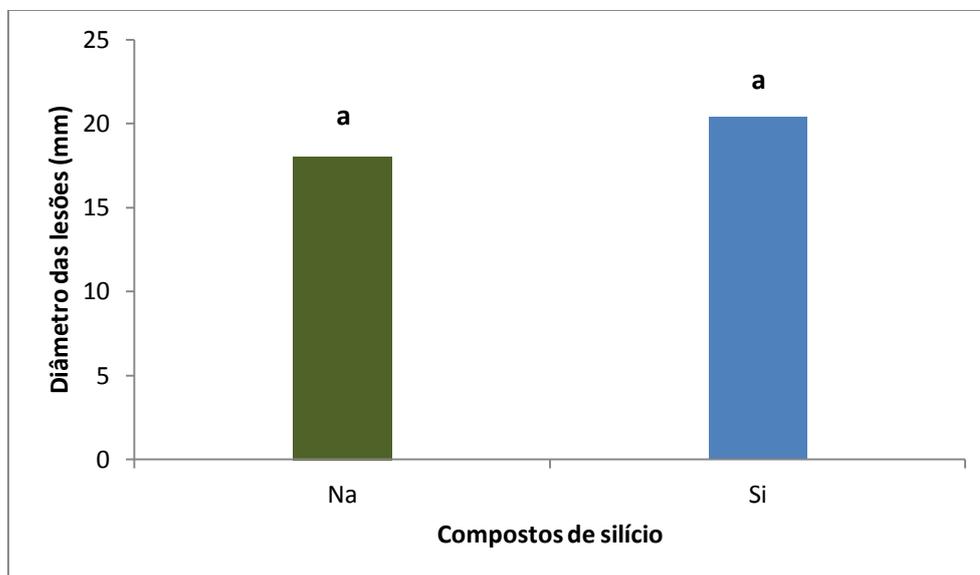


Figura 3 - Efeito de compostos de silício sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim. Na: silicato de sódio; Si: dióxido de silício. As médias representam os valores obtidos para duas concentrações (100 e 200 mM), para cada fonte de silício. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste F, no nível de 5% de probabilidade ($dms = 4,69069$).

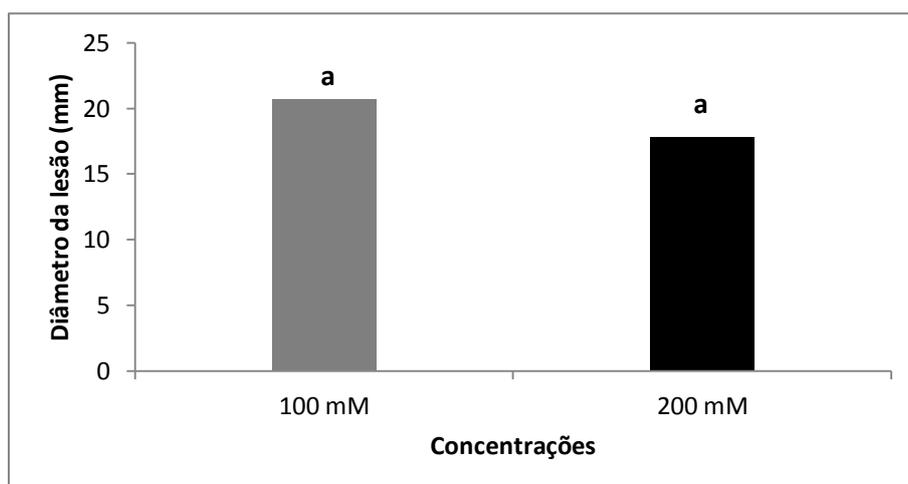


Figura 4 - Efeito das concentrações de compostos de silício (silicato de sódio e dióxido de silício) sobre a redução da severidade de antracnose em frutos de melão Acclaim. As médias representam os valores obtidos para os dois compostos de silício, para cada concentração. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo Teste F, no nível de 5% de probabilidade (dms= 4,69069).

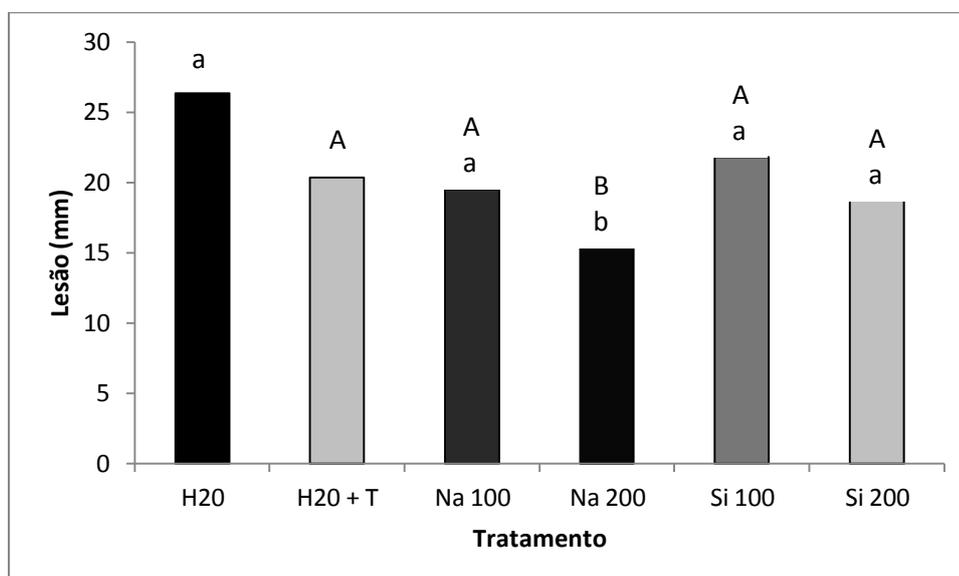


Figura 5 - Efeitos dos fatores: compostos de silício e concentrações na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum brevisporum*. Compostos de silício: Na - silicato de sódio; e Si - dióxido de silício. Concentrações: 25, 50, 100 e 200 mM. Controles: (1) H₂O – água; e (2) H₂O+T - água mais Tween 80. As médias seguidas da mesma letra do Controle1 (letra minúscula) ou Controle 2 (letra maiúscula), em uma mesma coluna, não diferem entre si, conforme o Teste de Dunnett, a 5% de probabilidade (dms=8,71805).

Não houve redução significativa com os outros tratamentos. Guo et al. (2007), trabalhando com indução de resistência ao patógeno *Trichothecium roseum*, observaram redução da severidade das lesões produzidas pelo patógeno, quando frutos de melão Chinese cantaloupe foram tratados com três concentrações de silicato de sódio e de dióxido de silício. Os autores encontraram que os dois compostos reduziram significativamente a severidade da doença em comparação com os controles (H₂O e H₂O + Tween 80), nas três concentrações, e que os frutos tratados com dióxido de silício, a 200 mM, tiveram a melhor resposta. Já Li et al. (2012), também trabalhando com indução de resistência de frutos de melão, cv. Yindi, a *T. roseum*, observaram redução do diâmetro das lesões produzidas pelo patógeno em 12.4%, dez dias após a indução. Segundo Walters, Ratsep e Havis (2013), os tratamentos para indução de resistência reduzem a severidade das doenças entre 20 e 85%. Portanto, o percentual encontrado no presente trabalho se enquadra dentro do esperado.

No entanto, esses autores usaram variedades de melão distintas da Acclaim, utilizada no presente trabalho, e sabe-se que o genótipo da planta tem grande influência na resposta a um elicitor (TUCCI et al., 2011; WALTERS et al., 2011; CÓRDOVA-CAMPOS et al., 2012; WALTERS; RATSET; HAVIS, 2013).

O fato de o pH ter um enorme aumento na presença de Na₂SiO₃, na concentração de 100 mM (pH de 12,36) ou superior, muito provavelmente, exerceu efeito sobre o patógeno *in vivo*, a exemplo do que foi aqui demonstrado *in vitro*.

Fungos preferem pHs mais ácidos para o seu desenvolvimento (BEDENDO; AMORIM, 2011) e, no caso de *C. brevisporum*, pH em torno de 12 parece ser o limite crítico de tolerância.

Li et al. (2009) observaram que a ação do Na₂SiO₃ na prevenção de doenças de plantas se dá, também, diretamente sobre o patógeno, inibindo a germinação dos esporos e o crescimento micelial de *Fusarium sulphureum*. Esse efeito pode também ter ocorrido neste experimento.

Os efeitos do silicato de sódio no controle de doenças estão relacionados com diversos mecanismos, como deposição de silício nas paredes celulares, o que aumenta a resistência física ao ataque de patógenos, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, e a estimulação de sistemas antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (LOON, REP; PIETERSE, 2006; LI et al., 2012).

Conclusão

Conclui-se que, silicato de sódio, em concentrações acima de 100 mM, inibe o crescimento micelial de *Colletotrichum brevisporum in vitro*, que este composto reduz a severidade de antracnose causada por este patógeno em 37,12% em frutos de melão da variedade Acclaim (Syngenta).

Referências bibliográficas

AROUCHA, E. M. M.; NUNES, G. H. S.; SOUSA, A. E. L. D.; FERNANDES, P. L. O.; SOUZA, M. S. Qualidade e potencial pós-colheita de híbridos de melão. **Revista Ceres**, v. 56, n. 2, p. 181-185, 2009.

AROUCHA, E. M. M.; DE MESQUITA H. C.; DE SOUZA M. S.; TORRES, W. L.; FERREIRA, R. M. A. Vida útil pós-colheita de cinco híbridos de melão amarelo produzidos no agropólo Mossoró-Assu. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 52-57, 2012.

BEDENDO, I. P.; AMORIM, L. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. E BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Ceres, 2011. v. I.

BI, Y.; LI, Y.; GE, Y.; WANG, Y. Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases. In: PRUSKY, D.; M. L. GULLINO (Eds.). *Postharvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century*. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V, 2010. v. 2, p. 31-41.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 181-213, 2012.

CARRÉ-MISSIO, V.; RODRIGUES, F. A.; SCHURT, D. A.; RESENDE, R. S.; SOUZA, N. F. A.; REZENDE, D. C.; MOREIRA, W. R.; ZAMBOLIM, L. Effect of foliar-applied potassium silicate on coffee leaf infection by *Hemileia vastatrix*. **Annals of Applied Biology**, v. 164, p. 396-403, 2014.

CÓRDOVA-CAMPOS, O.; ADAME-ÁLVAREZ, R. M.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; HEIL, M. Domestication affected the basal and induced disease resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 367-379, 2012.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; LIU, F. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 29-59, 2013.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Journal of Phytopathology**, v. 88, p. 282-291, 1998.

FAUTEAUX, F.; REMUS-BOREL, W.; MENZIES, J. G.; BELANGER, R. R. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 249, p. 1-6, 2005.

FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. 3. ed. Maceió: Editora da UFAL, 2000. 422p.

Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: Secretaria de Planejamento da Presidência da República. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em 28 de setembro de 2014.

GUO, Y.; LIU, L.; ZHAO, J.; BI, Y. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichotecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). **International Journal of Food and Technology**, v. 42, p. 1012-1018, 2007.

LI, Y. C.; BI, Y.; GE, Y. H.; SUN, X. J. WANG, Y. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot of potato tubers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 213-218, 2009.

LI, W.; BI, Y.; GE, Y.; LI, Y.; WANG, J.; WANG, Y. Effects of postharvest sodium silicate treatment on pink rot disease and oxidative stress-antioxidative system in muskmelon fruit. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 137-145, 2012.

LOON, L.C. van; REP, M.; PIETERSE C. .M. .J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

NOIREUNG, P.; PHOULIVONG, S.; LIU, F; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; JONES, E.B.G.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K.D. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 33, n. 3, Numero special Coelomycetes, p. 347-362, 2012.

PAUL, N. C.; LEE, H. B.; LEE, J. H.; SHIN, K. S.; RYU, T. H.; KWON, H. R.; KIM, Y. K.; YOUN, Y. N.; YU, S. H. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 15272-15286, 2014.

SMITH-BECKER, J.; KEEN, N. T.; BECKER, J.O. Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. **Crop Protection**, v. 22, p. 769-774, 2003.

TUCCI, M.; RUOCCO, M.; DE MASI, L.; DE PALMA, M.; LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 341-354, 2011.

VIEIRA, W.A.S.; NASCIMENTO, R. J.; MICHEREFF, S.J.; HYDE, K.D.; CÂMARA, M.P.S. First report of papaya fruit anthracnose caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, p. 1659, 2013.

WALTERS, D. R.; HAVIS, N. D.; PATERSON, L.; TAYLOR, J.; WALSH, D. J. Cultivar effects on the expression of induced resistance in spring barley. **Plant Disease**, v. 95, p. 595-600, 2011.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p.115-180, 2012.