

# VIABILIDADE DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA *Penicillium italicum* NA FASE DE PÓS-COLHEITA

BRUNO B. CONVENTO<sup>1</sup>; KATIA C. KUPPER<sup>2</sup>; MARCOS R. LOPES<sup>3</sup>;  
ALINE C. da SILVA<sup>4</sup>; MARIANA N. KLEIN<sup>4</sup>.

Nº0900007

## ABSTRACT

The citrus represents one of the most important economic activities of Brazilian's current agriculture. However, this sector has several problems during the production processes; among these problems, the blue mold, caused by *Penicillium italicum*, can be considered one of the most communal fungal postharvest disease. In front of the large losses of production and the popular concern with the absence of residues in fruit's surface, the citrus producers are looking for new and less harmful alternatives to control this disease. Therefore, the objective of this project is to evaluate the efficiency of biological control agents (BCA) *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in the control of *Penicillium italicum*, in Tahiti lime fruits. Through the evaluated results, was verified, that among both BCA, *S. cerevisiae* presented major potential than *B. subtilis*, in the control of disease.

## RESUMO

A citricultura representa uma das mais importantes atividades econômicas da agricultura brasileira, este setor enfrenta vários problemas; Dentre eles, a podridão-azul, causada por *Penicillium italicum*, responsável por grandes perdas de frutos cítricos em fase de comercialização. Com o crescimento do consumo de alimentos isentos de agrotóxicos, produtores têm buscado novas alternativas de controle, dentre estas, encontra-se o controle biológico. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de agentes de controle biológico (ACBs), *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, no controle de *Penicillium italicum*. Pelos resultados obtidos, verificou-se que, todos os agentes de biocontrole testados inibiram a germinação do fitopatógeno, sendo que os ACBs AP3, 83 e 84 apresentaram inibições acima de 50% em relação à testemunha. Os resultados *in vivo* mostraram maior potencialidade de *S. cerevisiae* para o controle de *P. italicum* do que a bactéria *B. subtilis*. Quando os frutos de lima ácida Tahiti foram tratados com o isolado K-1, tanto preventiva como de forma curativamente, a eficiência de controle foi acima de 85%.

1.BOLSISTA CNPq: Graduando em Engenharia Agrônoma, UFSCar, Araras -SP, ✉ [AgroBruBra@hotmail.com](mailto:AgroBruBra@hotmail.com)

2.ORIENTADOR: Pesquisadora, Centro APTA de Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis – SP

3.COLABORADOR: Graduando em Eng. Agrônoma, UFSCar, Araras –SP

4.COLABORADORAS: Graduando em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras -SP

## INTRODUÇÃO

A lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka) tem assumido cada vez mais importância na citricultura brasileira. Por tratar-se de uma variedade que satisfaz as exigências do mercado consumidor quanto à qualidade do suco, ao sabor, óleo da casca, ao tamanho do fruto e ausência de sementes, tem favorecido à exportação e importação dos frutos (BARROS et al., 1991). A produção no Brasil de lima ácida 'Tahiti' no ano de 2002 correspondeu a 984.551 toneladas, sendo, o estado de São Paulo o maior produtor com 70% da produção brasileira (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2005). O pico da colheita deste cultivar ocorre durante os meses de abril a maio, época em que o preço de mercado alcança um mínimo não compensando se quer as despesas de colheita e transporte. Portanto, o abastecimento do mercado na entressafra e o tempo de transporte para a exportação da fruta são as principais preocupações dos produtores (MIZOBUTSI et al., 2000). Diante do exposto, o agricultor se preocupa ainda mais com as possíveis doenças que ocorrem na fase de pós-colheita, sendo estas, responsáveis pela diminuição da qualidade e quantidade dos frutos cítricos, prejudicando consideravelmente os valores nutricionais e de mercado. Dentre tais doenças, destaca-se o bolor azul, causado por *Penicillium italicum*, responsável por grandes perdas na produção de frutos cítricos, especialmente, na fase de comercialização.

As medidas de controle atuais baseiam-se no tratamento de frutos com diferentes combinações de fungicidas no packing-house. Porém, dada a crescente restrição ao uso de fungicidas em pós-colheita, a demanda por produtos orgânicos e o problema com o desenvolvimento de linhagens resistentes aos fungicidas (BUS et al., 1991, ECKERT et al., 1994), torna-se necessário a busca por produtos alternativos de controle.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de agentes de controle biológico (ACBs), *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Penicillium italicum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foram utilizados seis isolados de *Bacillus subtilis* (ACBs AP3, 12, 66, 69, 83 e 84), os quais foram obtidos de flores e folhas de citros (KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002), seis isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (BG-1, CAT-1, CR-1, K-1, KD-1 e PE-2), gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Pascholatti da ESALQ/USP (Piracicaba/SP) e um isolado de *Penicillium italicum* pertencente à micoteca do Centro Apta Citros 'Sylvio Moreira', Cordeirópolis/SP.

### **Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de *Penicillium italicum***

Para avaliar a influência dos agentes de biocontrole sobre a germinação de *P. italicum*, os diferentes ACBs foram repicadas para placas de Petri contendo BDA e incubadas por dois dias, em estufa para BOD, a 27°C, fotoperíodo 12/12h. Após esse período foi obtido uma suspensão de células bacterianas e de leveduras de  $1 \times 10^7$  ufc/mL.

Para estudar a inibição da germinação dos conídios do fitopatógeno, alíquotas de 20µL das suspensões dos possíveis antagonistas ( $1 \times 10^7$  ufc/mL) foram depositadas em áreas demarcadas de lâminas previamente preparadas, contendo ágar-água, adicionando-se a seguir 20µL da suspensão de *P. citri* ( $1 \times 10^4$  conídios/mL). Para o tratamento testemunha foram colocadas alíquotas de água no lugar dos ACBs. Depois de montadas as lâminas, as culturas foram incubadas em estufa para BOD, na temperatura de  $23^\circ\text{C} \pm 2$ , em luz contínua por 18 horas. Ao término do período de incubação, procedeu-se a avaliação, através da contagem de conídios germinados num total de 100 conídios, avaliados ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por cinco repetições.

### **Eficiência *in vivo* dos agentes de biocontrole no controle de *P. italicum***

Frutos de lima ácida 'Tahiti' foram esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,7% e, feridos em dois pontos eqüidistantes, na região equatorial dos frutos, com agulhas esterilizadas a uma profundidade de 3mm. Em seguida, os frutos foram inoculados com o fitopatógeno na concentração de  $10^5$  esporos/ mL, vinte e quatro horas antes e 24 h depois da realização dos tratamentos com os agentes de biocontrole.

Para a realização dos tratamentos, os frutos foram imersos por 3 minutos em suspensões de cada um dos respectivos agentes de controle biológico (contendo  $1 \times 10^7$  ufc/mL). Após inoculação e tratamento, os frutos foram armazenados em condições ambiente ( $23^\circ\text{C} \pm 2$  e e com 70% de UR). Os ACBs foram comparados com o tratamento testemunha (frutos tratados com água no lugar dos ACBs) e com o tratamento químico padrão utilizado para controle da doença.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com cada tratamento repetido 3 vezes, sendo que para cada repetição foram utilizados 20 frutos. A avaliação correspondeu à determinação da porcentagem de frutos sadios e as médias foram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUÇÃO

### Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de *Penicillium italicum*

O efeito de *B. subtilis* e de *S. cerevisiae* sobre a germinação de conídios de *P. italicum* pode ser observado na Tabela 1. De acordo com os dados obtidos, nota-se que todos os agentes de biocontrole testados inibiram a germinação do fitopatógeno, sendo que os ACBs AP3, 83 e 84 apresentaram inibições acima de 50% com relação à testemunha.

**TABELA 01-** Influência de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios de *Penicillium italicum*.

Tratamentos	Porcentagem de conídios germinados
Testemunha	89,10 a <sup>(1)</sup>
ACB- CAT1	63,60 b
ACB-12	61,30 bc
ACB-K1	59,90 bc
ACB-KD1	59,90 bc
ACB-BG1	58,50 bc
ACB-PE2	56,50 bc
ACB-CR1	55,80 bc
ACB-69	51,30 cd
ACB-66	51,20 cd
ACB-AP3	43,60 d
ACB-83	41,90 d
ACB-84	41,20 d

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### Eficiência *in vivo* dos agentes de biocontrole no controle de *P. italicum*

Verifica-se que, dentre os isolados de *B. subtilis* testados, a maior quantidade de frutos sem sintomas foi obtida quando os frutos foram tratados preventivamente com ACB-69, com eficiência de controle em torno de 62%. Tal tratamento não diferiu dos tratamentos referentes aos ACBs 84 e 66 (45 e 43% frutos sadios, respectivamente), porém diferiu do melhor tratamento (imazalil), que promoveu 100% de frutos sem sintomas de bolor azul (Tabela 02).

Com relação aos frutos tratados com *S. cerevisiae*, observa-se que, os melhores resultados foram obtidos, quando os frutos foram tratados com K-1 preventiva e curativamente, com eficiência de controle de 88 e 87%, respectivamente (Tabela 03). Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram o potencial de agentes de controle biológico para o controle de uma das mais importantes doenças de pós-colheita de citros, o bolor azul. Sob o ponto de vista de segurança alimentar, um aspecto a ser considerado, é a possibilidade de agentes de biocontrole, ao apresentarem antibiose, como um de seus mecanismos de ação, poderem deixar algum resíduo em frutos para consumo *in natura*. Com isso, abre-se a perspectiva do emprego de leveduras para o biocontrole, devido, principalmente, à baixa possibilidade micotoxigênica deste grupo de microrganismo, grandemente utilizado em muitos processos fermentativos.

**TABELA 02-** Porcentagem de frutos sadios após tratamento curativo e preventivo com *Bacillus subtilis* e inoculação com *Penicillium italicum*.

Tratamentos	Porcentagem de frutos sadios	
	Tratamento Preventivo	Tratamento Curativo
Imazalil	100,00 a <sup>(1)</sup>	100,00 a
ACB-66	43,30 bc	18,33 b
ACB-84	45,00 bc	11,66 b
ACB-69	61,66 b	11,66 b
ACB-12	16,66 cd	8,33 b
ACB-AP3	31,66 bcd	8,33 b
ACB-83	21,66 cd	6,66 b
Testemunha	8,33 d	0,00 b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**TABELA 03-** Porcentagem de frutos sadios após tratamento curativo e preventivo com *Saccharomyces cerevisiae* e inoculação com *Penicillium italicum*.

Tratamentos	Porcentagem de frutos sadios	
	Tratamento Preventivo	Tratamento Curativo
Imazalil	100,00 a <sup>(1)</sup>	100,00 a
ACB-K1	88,33 a	86,66 a
ACB-PE 2	36,66 b	18,35 b
ACB-CR 1	28,33 bc	5,00 b
ACB-CAT 1	23,33 bc	25,00 b
ACB-KD 1	21,66 bc	21,66 b
ACB-BG 1	16,66 cd	0,00 b
Testemunha	0,00 d	0,00 b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De um modo geral, os resultados apresentados neste estudo mostraram maior potencialidade de *S. cerevisiae* para o controle de *P. italicum* do que a bactéria *B. subtilis*. Quando os frutos de lima ácida Tahiti foram tratados com o isolado K-1, tanto preventiva como curativamente, a eficiência de controle foi acima de 85%. Os resultados deste trabalho parecem compartilhar como os obtidos por SANTOS et al. (1996), os quais trabalhando com leveduras confirmaram a eficiência das mesmas no controle de fitopatógenos que atacam flores e frutos tropicais do semi-árido brasileiro.

## CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o isolado K-1 de *S. cerevisiae* tem potencial para ser utilizado como uma alternativa de controle para o bolor azul, em frutos de lima ácida Tahiti.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, S.A., RODRIGUES, J.D., RODRIGUES, S.D. Efeito do ácido giberélico e do uniconazole na fisiologia pós-colheita do limão 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, p. 223-226, 1991.
- BUS, V.G., BONGERS, A.J. & RISSE, L.A. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. **Plant Disease**, v. 75, p.1098-1100, 1991.
- ECKERT, J.W., SIEVERT, J.R. & RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, v.78, p.971-974, 1994.
- FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVO. Laranja. In: Agrianual 2006: anuário da agricultura brasileira. p.257-300, 2005.
- KUPPER K.C. & GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida "Tahiti". **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 292-295, 2002.
- MIZOBUTSI, G.P.; BORGES, C.A.M.; SIQUEIRA, D.L. Conservação pós- colheita da lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), tratada com ácido giberélico e armazenada em três temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, p. 42-47, 2000.
- SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, R.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.. Yeasts associated with flowers and fruits from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Ver. Microbiology**, v.27, n.1, p.33-40, 1996.